

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata

XXIV ciclo

(2008-2011)



Tesi di Dottorato

**Glucosio-6P deidrogenasi citosolica di orzo:
overespressione, caratterizzazione e
regolazione da stress biotico e da sugar sensing**

**Cytosolic Glucose-6P dehydrogenase in barley:
overexpression, characterization and
regulation by biotic stress and sugar sensing**

Tutore	Candidata	Coordinatore
Ch.mo Prof.	Dott.ssa	Ch.mo Prof.
Sergio Esposito	Daniela Castiglia	Ezio Ricca

INDICE

Abstract

pag 5

CAPITOLO 1:

Introduzione

1.1 Il ciclo dell'OPPP pag 6

1.2 Glucosio-6-fosfato deidrogenasi pag 15

1.2.1 Analisi filogenetica della G6PDH pag 18

1.2.2 Regolazione G6PDH da parte del rapporto

NADPH/NADP⁺ pag 21

1.2.3 Isoforme plastidiali G6PDH e regolazione redox pag 22

1.2.4 Isoforma citosolica G6PDH e regolazione

“sugar-sensing” pag 26

1.3 G6PDH e stress abiotici pag 29

1.3.1 G6PDH e metabolismo azotato pag 31

1.4 G6PDH e stress biotico pag 33

1.4.1 L'orzo e *Blumeria graminis* sp. *hordei* pag 41

1.4.2 Geni resistenza nell'orzo pag 43

1.5 Scopo del progetto di dottorato pag 45

CAPITOLO 2 :

Materiali e metodi

2.1 Organismo e condizioni di coltura pag 46

2.1.1 Esperimenti sullo “sugar sensing” pag 47

2.2 Estrazione dell’RNA pag 47

2.2.1 Disegno dei primers pag 48

2.2.2 PCR e sequenziamento pag 50

2.3 Clonaggio della sequenza G6PDH citosolica pag 52

2.3.1 Crescita dei batteri ricombinanti pag 54

2.3.2 Test di espressione pag 54

2.3.3 Produzione e purificazione della cyt- G6PDH-pET3d pag 55

2.4 Saggi enzimatici pag 57

2.4.1 Preparazione dell’estratto grezzo pag 57

2.4.2 Determinazione delle proteine pag 58

2.4.3 Determinazione della attività G6PDH pag 58

2.4.4 Trattamento campioni con DTT pag 58

2.4.5 Determinazione delle caratteristiche cinetiche pag 59

- 2.5** Elettroforesi SDS-PAGE e Western blotting pag 59
- 2.6** Esperimenti di infezione con *Blumeria graminis* pag 61
 - 2.6.1** Selezione delle cultivar di orzo e dei ceppi patogeni pag 61
 - 2.6.2** Crescita delle piante di orzo pag 62
 - 2.6.3** Infezione delle piante con *Blumeria graminis* pag 62
 - 2.6.4** Estrazione RNA e Real-time PCR pag 63
- 2.7** Analisi bioinformatica pag 66

CAPITOLO 3:

Risultati

- 3.1** Isolamento della sequenza codificante cyt-G6PDH pag 69
 - 3.1.1** Allineamento delle sequenze ed analisi filogenetica pag 73
 - 3.1.2** Determinazione della sequenza cyt-G6PDH da foglie pag 79
 - 3.1.3** Struttura tridimensionale putativa della cyt-G6PDH pag 81
- 3.2** Overespressione e purificazione della cyt-G6PDH pag 83
 - 3.2.1** Determinazione dei parametri cinetici della cyt-G6PDH pag 89
- 3.3** Regolazione dell'attività della cyt-G6PDH da zuccheri pag 93
- 3.4** G6PDH e stress biotico pag 95

CAPITOLO 4:

Discussione

pag 101

Conclusioni e riepilogo

pag 115

CAPITOLO 5

Bibliografia

pag 116

CAPITOLO 6

Abbreviazioni

pag 127

Appendice

pag 130

Abstract

A Glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) encoding sequence was obtained from barley (*Hordeum vulgare* cv. Nure) roots and leaves. This sequence was 1767 bp long, and encoded for a 509 aminoacids long protein.

The derived amino acid sequence was compared with known G6PDH sequences from various sources. The phylogenetic analisys suggests that this sequence would produce a cytosolic G6PDH isoform (cyt- G6PDH).

This coding sequence was cloned in the expression vector pET-3d and recombinant cyt-G6PDH protein overexpressed in *E.coli* BL21 (DE3).

The recombinant protein was purified and characterized. The enzyme specifically reacts vs potato cyt-G6PDH antibodies and exhibits kinetic parameters in agreement with those measured on cyt-G6PDH previously purified from barley roots.

In vivo, the cyt-G6PDH expression level increased in the leaves upon infection with *Blumeria graminis*, more intensively in resistant plants with respect to susceptible plants, suggesting a main role of this isoform in the defence mechanisms developed in plants in both in specific and aspecific response to pathogens. Moreover, the regulation of cyt-G6PDH appears to be triggered by sugar sensing mechanisms: enzyme activity increased in hydroponic-grown plants upon 50mM fructose supply, sharper in roots than in leaves.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Il ciclo dell'OPPP

La via del pentoso fosfato (Oxidative pentose phosphate pathway - OPPP) è un processo metabolico primario la cui funzione principale è quella di generare il cofattore ridotto NADPH usato nei processi biosintetici, come la sintesi degli acidi grassi (Htchings et al., 2005) e l'assimilazione del nitrato (Bowsher et al., 1989). Questa via, inoltre, fornisce il ribosio-5P (Ri5P), necessario per la sintesi degli acidi nucleici, e l'eritrosio-4P (E4P) (prodotto essenzialmente nel plastidio), necessario per la produzione di numerosi composti aromatici nel percorso metabolico dello scichimato, parte integrante della sintesi delle basi azotate, aminoacidi aromatici e i loro derivati (Kruger e von Schaewen, 2003). La OPPP svolge inoltre un importante ruolo nella risposta agli stress abiotici (Bredemeijer e Esselink, 1995; Nemoto e Sasakuma, 2000; Wang et al., 2008) e biotici (Sindelar et al., 1999; Scharte et al., 2005, 2009).

Il ciclo dell'OPPP (figura 1.1) è caratterizzato da una prima parte irreversibile, definita fase ossidativa, durante la quale si ha la riduzione di due molecole di NADPH e la liberazione di una molecola di CO₂ a partire dal glucosio-6P (G6P). Nella seconda parte, definita fase non ossidativa, viene rigenerato l'esoso attraverso la formazione di intermedi a 5 atomi di carbonio.

La reversibilità delle reazioni della fase non ossidativa permette di mantenere il bilancio dei vari intermedi del ciclo che deviano verso i numerosi processi metabolici che li richiedono. In questa fase della OPPP si formano anche composti comuni alla glicolisi, come la gliceraldeide-3P (G3P) e il fruttosio-6P (F6P); questo crea un collegamento metabolico tra le due vie, con la possibilità di modulare il flusso citosolico di metaboliti, a seconda delle esigenze biosintetiche supportate dalla OPPP o respiratorie supportate dalla glicolisi.

Questa integrazione con la via glicolitica porta a considerare la OPPP come una diramazione (*shunt*) della glicolisi stessa, che inizia il percorso proprio dal glucosio-6P per immettersi nuovamente nel percorso glicolitico a livello del fruttosio-6P e della gliceraldeide-3P.

La prima reazione della OPPP è catalizzata dalla, glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) (EC11.1.49): il glucosio-6 fosfato viene ossidato a 6-fosfoglucono- δ -lattone, in concomitanza con la riduzione del NADP^+ in NADPH; successivamente l'idrolisi, di per sé spontanea, del 6-fosfoglucono- δ -lattone a 6-fosfogluconato viene catalizzata da una specifica lattonasi.

Nella successiva reazione il 6-fosfogluconato subisce una decarbossilazione ossidativa ad opera della 6-fosfogluconato deidrogenasi (6PGDH), anch'essa NADP^+ dipendente, con la liberazione di una molecola di CO_2 , con la riduzione di una ulteriore molecola di NADPH e la con formazione del pentoso fosfato ribulosio-5P.

La seconda fase (non ossidativa) della via dei pentosi fosfati comprende una serie di reazioni reversibili con numerosi intermedi ed enzimi comuni con quelli della fase di rigenerazione del ciclo di Calvin. Il ribulosio-5P viene trasformato in xilulosio-5P (Xlu5P) da una pentoso-fosfato epimerasi e in ribosio-5P da una pentoso-fosfato isomerasi. Una transchetolasi (TK) stacca poi dal ribosio-5P una frazione a 2 atomi di carbonio (glicolaldeide attiva) che viene addizionata allo xilulosio-5 P con la produzione di sedoeptulosio-7P e gliceraldeide-3P. I due composti a 7 e 3 atomi di carbonio vengono riassemblati da una transaldolasi (TA) per formare fruttosio-6P e eritrosio-4P.

Un'ulteriore reazione transchetolasica trasferisce dallo xilulosio-5P all'eritrosio-4P una frazione di glicolaldeide attiva (2C), con la produzione di fruttosio 6P e gliceraldeide-3P. Infine la reazione della esoso fosfato isomerasi riforma il glucosio 6P dal fruttosio 6P chiudendo il ciclo OPPP.

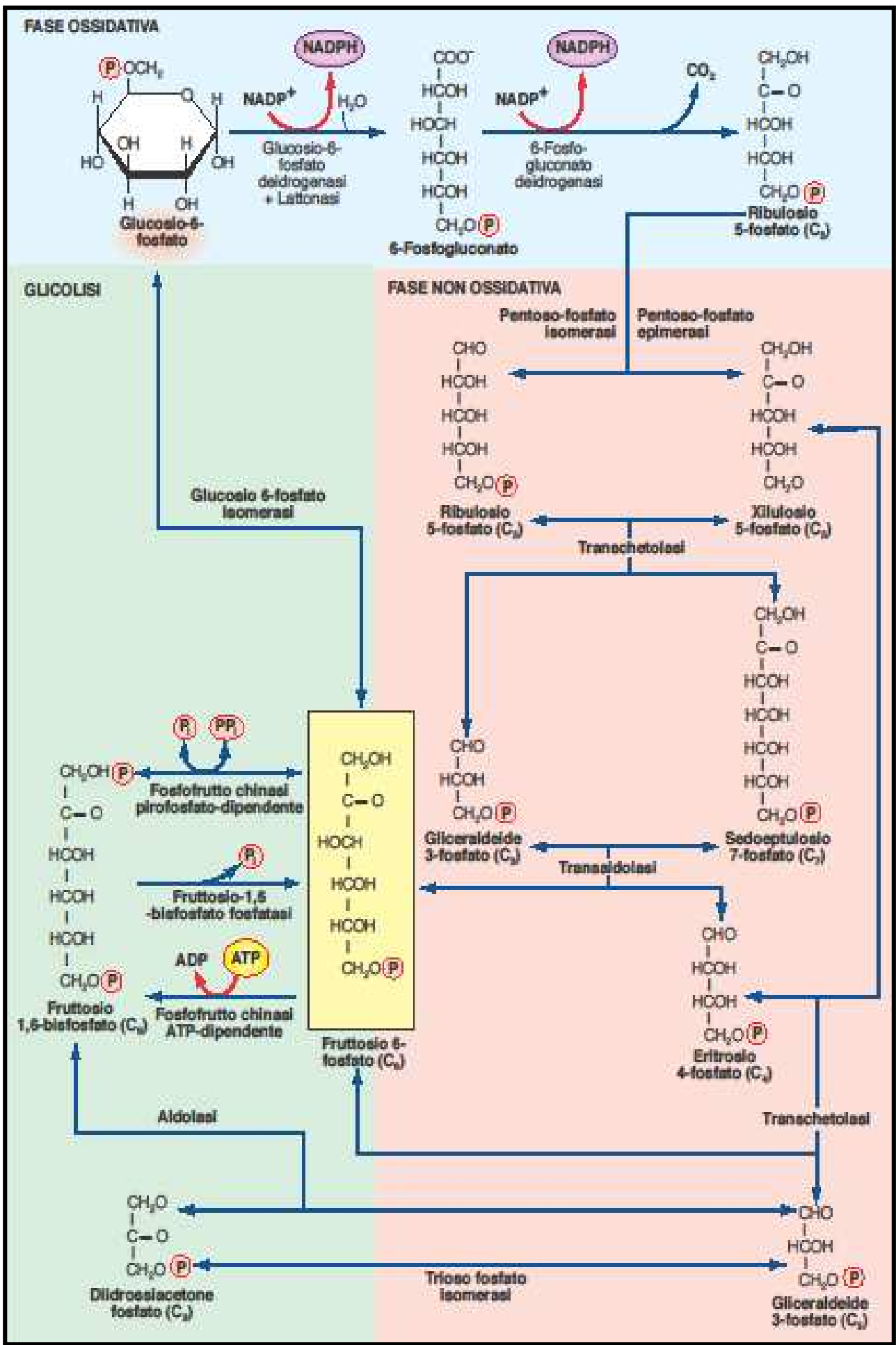


Figura 1.1. Via ossidativa dei pentosi fosfati.
Nella figura sono rappresentate su sfondo di colori diversi le reazioni della fase ossidativa (azzurro) e di quella non ossidativa (rosa) della via dei pentosi fosfati e i collegamenti metabolici di questa con la via glicolitica (verde).

Gli enzimi della fase ossidativa del ciclo dell'OPPP (G6PDH e 6PGDH) sono presenti, nelle piante, sia nel citosol sia nei cloroplasti delle cellule fotosintetiche (Schnarrenberger et al., 1973) che nei plastidi delle cellule dei tessuti non - fotosintetici (Nishimura e Beevers, 1981).

Questa duplicazione subcellulare della fase ossidativa è caratteristica degli organismi vegetali (Kruger e von Schaewen, 2003), anche se nelle cellule umane è nota una isoforma G6PDH presente nel reticolo endoplasmico (Wilma et al., 2001).

L'organizzazione degli enzimi della fase non ossidativa del processo non è stata del tutto chiarita. Dallo studio delle frazioni plastidiale e citosolica di numerose piante superiori è stato dimostrato che il set di enzimi della fase non ossidativa è completo solo nei plastidi, diversamente in tabacco tutti gli enzimi sono presenti in entrambi i compartimenti (Debnam e Emes 1999). In *Arabidopsis* lo studio delle sequenze genomiche ha dimostrato la presenza di geni che codificano per isoforme plastidiali e citosoliche di ribosio-5-fosfato isomerasi e ribulosio-5-fosfato epimerasi, mentre transchetolasi (TK) e transaldolasi (TA) sono confinate esclusivamente nei plastidi (Kruger e von Schaewen, 2003). Resta quindi poco chiara la localizzazione dei vari enzimi della fase non-ossidativa ed è presumibile che la loro organizzazione e distribuzione non sia fissa, potendo variare tra specie, tessuti, stadio di sviluppo e condizioni di crescita (Debnam e Emes 1999; Kruger e von Schaewen, 2003).

Recentemente per le reazioni non ossidative del ciclo è stato proposto un modello alternativo (figura 1.2) rispetto a quello

convenzionale. È stato mostrato che TK e TA presentano un'ampia specificità di substrato e ciò permette l'identificazione di nuovi intermedi e coinvolge l'aggiunta di nuovi metaboliti come l'ottulosio-8P.

I due cicli risultano nella stessa distribuzione di atomi di carbonio all'interno del percorso metabolico, e quindi non c'è una prova definitiva che favorisca uno dei due schemi. È probabile che la fase non-ossidativo del OPPP sia in un equilibrio dinamico in funzione delle necessità cellulari e che quindi spinga, a seconda dell'esigenza, verso la formazione dei diversi intermedi.

Si può presumere che quantità variabili di ribosio 5-fosfato e eritrosio 4-fosfato vengano utilizzati per la sintesi dei nucleotidi e la produzione di fenilpropanoidi, rispettivamente, attraverso la via dell'acido shichimico, determinando una alternanza dinamica dei due diversi percorsi metabolici (Kruger e von Schaewen, 2003).

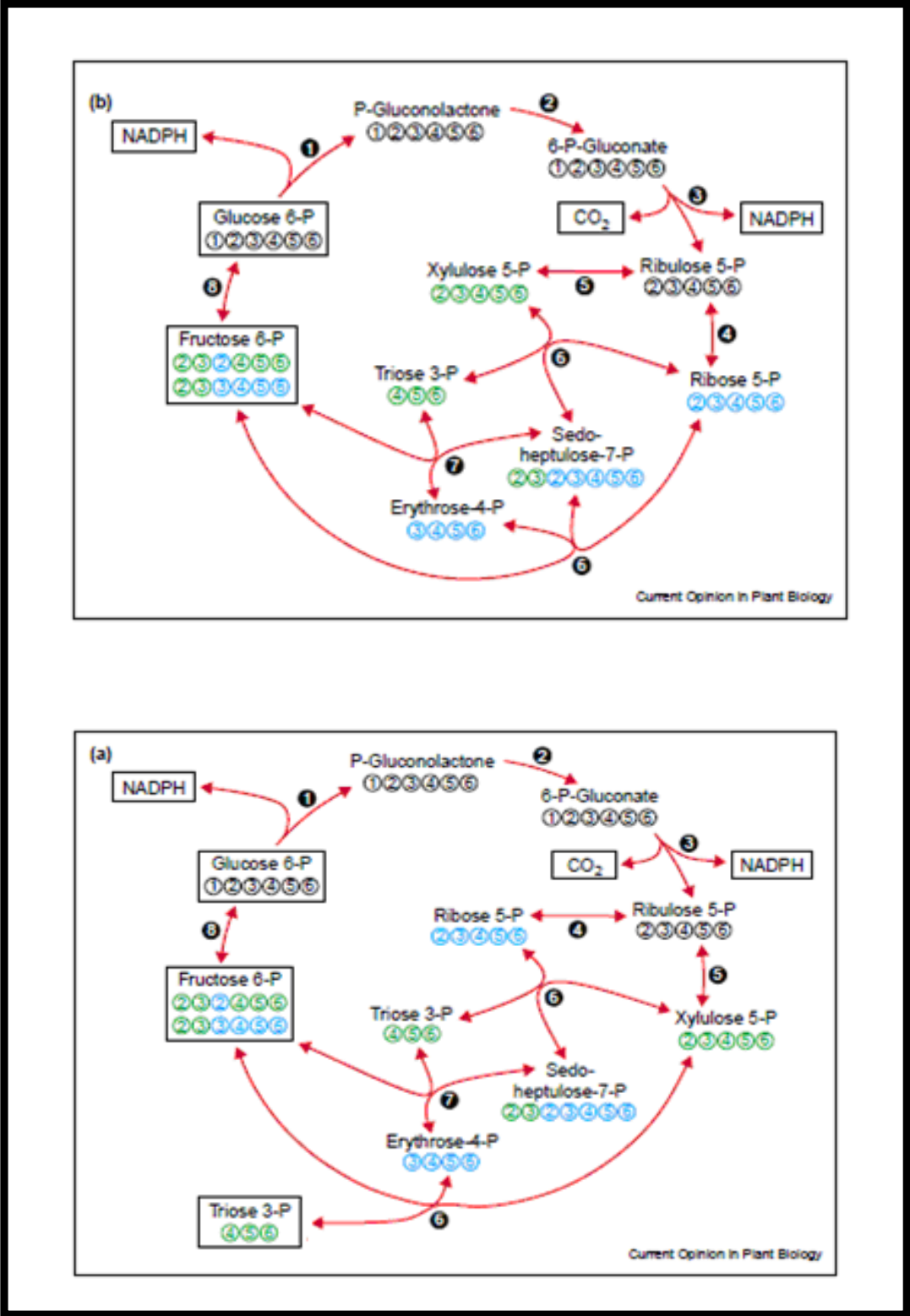


Figura 1.2: Ciclo dell’OPPP e sue possibili varianti.

In alto ciclo convenzionale; in basso ciclo alternativo.

Leggenda: Il numero sotto ogni composto indica il destino di ogni singolo atomo di carbonio del glucosio6-P che entra nel ciclo attraverso il percorso ossidativo. I differenti colori sono utilizzati per distinguere gli atomi di carbonio che derivano dal ribosio-5P (blu) e dallo xilulosio-5P (verde). Gli enzimi che catalizzano la reazione sono: 1) glucosio-6P deidrogenasi (EC 1.1.1.49), 2) 6-fosfogluconatodeltalattonasi (EC 3.1.1.31), 3) 6-fosfogluconato deidrogenasi (EC 1.1.1.44), 4) ribosio-5P isomerasi (EC 5.1.3.1), 5) ribosio-5P 3.epimerasi (EC 5.1.3.1), 6) tranchetolasi (EC 2.2.1.1), 7) transaldolasi (EC 2.2.1.2), 8) glucosio6P isomerasi (EC 5.3.1.9). (Kruger e von Schaewen, 2003).

Le interazioni tra i processi plastidiali e citosolici del ciclo dell'OPPP sono garantiti dalla famiglia dei trasportatori della membrana plastidiale.

Sulla membrana plastidiale sono infatti presenti numerosi di trasportatori (figura 1.3) che si occupano del movimento di sostanze fra il plastidio e il citosol, garantendo il rifornimento di sostanze ai cicli metabolici presenti all'interno del plastidio e viceversa liberando il plastidio dall'accumulo di prodotti metabolici necessari nel citosol.

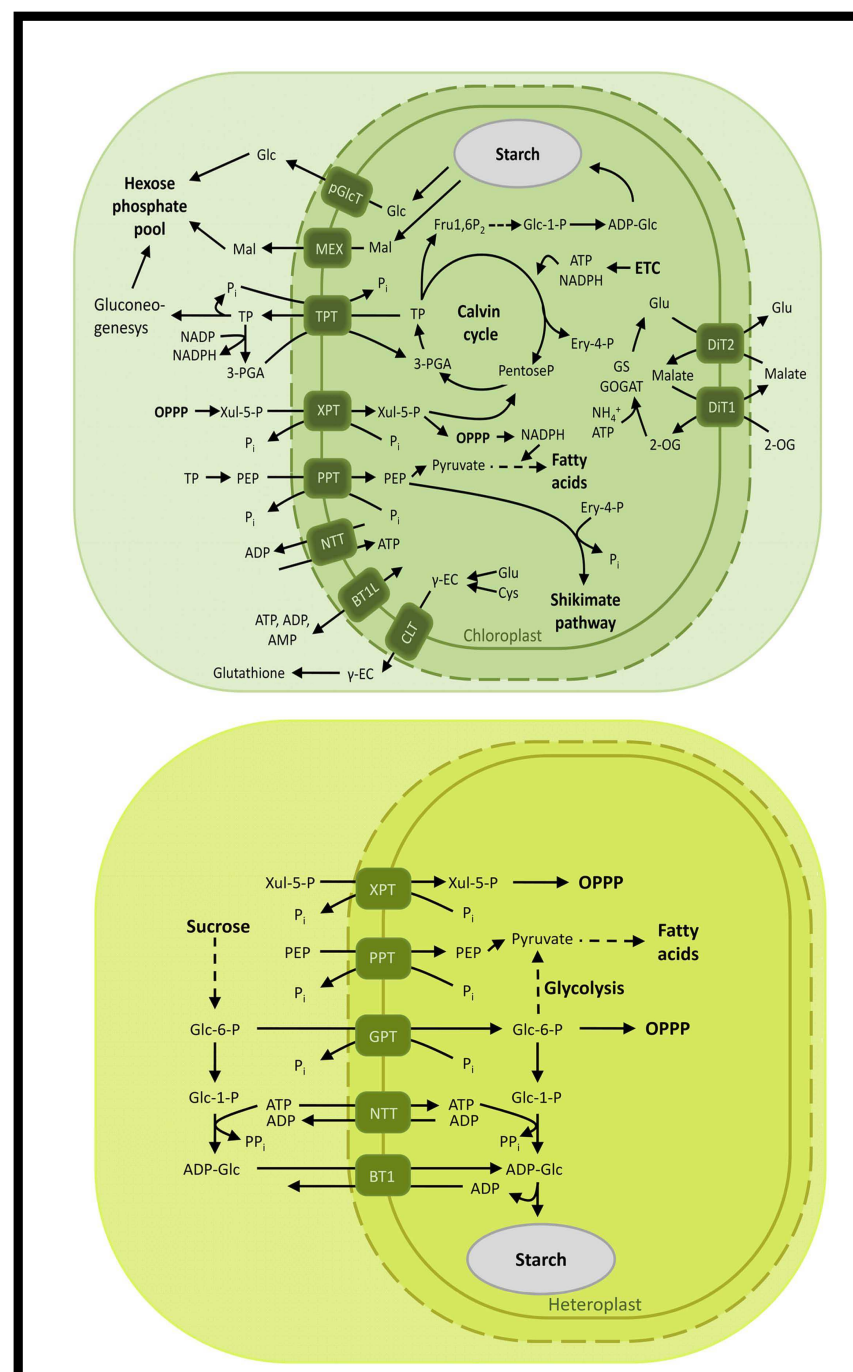


Figura 1.3: Principali trasportatori di membrana nei plastidi. In alto cloroplasto, in basso plastidio non fotosintetico (da Facchinelli e Weber, 2011).

In particolare nel ciclo dell'OPPP sono coinvolti il trasportatore G6P/fosfato (GPT), il trasportatore Xi5P/fosfato (XPT), e il trasportatore fosfoenolpiruvato/fosfato (PPT).

Il glucosio-6-fosfato entra nei plastidi mediante il trasportatore GPT in scambio con i trioso fosfati o l'ortofosfato (Pi). Tale trasportatore è principalmente espresso nei tessuti non-verdi coinvolti nella conservazione dei fotoassimilati (Eicks et al., 2002).

L'importanza del ruolo del GPT nella OPPP è dimostrata dal silenziamento di tale gene in *Arabidopsis*, infatti tale silenziamento genera un fenotipo letale probabilmente dovuto alla mancanza di NADPH prodotto dall'OPPP necessario per la biosintesi degli acidi grassi (Facchinelli e Weber, 2011).

I pentosi vengono invece trasportati dal trasportatore XPT; il gene che codifica per XPT è espresso in tutta la pianta, indicando un generale ruolo di questo carrier nel metabolismo della pianta (Eicks et al., 2002).

In modo indiretto, nell'interscambio degli intermedi dell'OPPP è coinvolto anche il trasportatore fosfoenolpiruvato/fosfato, richiesto per l'ingresso del fosfoenolpiruvato (PEP) nel plastidio.

Il PEP, insieme all'eritrosio-4-fosfato, altro intermedio della OPPP (e del ciclo di Calvin), sono necessari per il ciclo dello scichimato, esclusivamente localizzato nei plastidi, coinvolto nella sintesi di amminoacidi aromatici e dei composti secondari come lignina, alcaloidi e flavonoidi (Facchinelli e Weber, 2011).

1.2 Glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH)

La G6PDH rappresenta il principale regolatore del ciclo ossidativo dei pentosi fosfati catalizzando la reazione limite del ciclo sia negli animali che nelle piante.

Nei batteri, un certo numero di G6PDH sono in grado di utilizzare NAD^+ al posto del NADP^+ (Anderson et al., 1997), ma tutte le isoforme degli organismi superiori studiate finora sono altamente specifiche per i loro substrati, G6P e NADP^+ , suggerendo che le proprietà dell'enzima sono state conservate nel corso dell'evoluzione.

L'enzima si trova in forma nativa come dimero o tetramero (Kruger e von Schaewen 2003); studi sull'enzima umano confermano tale struttura (Shannon et al., 2000). Anche le dimensioni della subunità sono molto conservate, con un peso stimato tra i 50 e i 67 kDa (Shannon et al., 2000; Wendt et al., 2000; Kruger e von Schaewen 2003).

La maggior parte delle G6PDH finora caratterizzate mostra cinetiche iperboliche, mentre gli enzimi cianobatterici mostrano una cinetica sigmoidale (Schaeffer e Stanier, 1978).

L'attività e l'espressione della G6PDH sono modulate da una serie di fattori come la luce; il NADPH e i riducenti; stress abiotici come la salinità (Nemoto e Sasakuma, 2000) e la limitazione di nutrienti (Esposito et al., 2001b; 2005); e stress biotici quali attacchi di funghi (Batz et al., 1998), patogeni virali (Sindelar e Sindelarova, 2002), e batteri (Scharte et al., 2005).

E' stato ormai dimostrato che nelle piante superiori sono presenti almeno tre isoforme della G6PDH: citosolica (cyt-G6PDH), cloroplastica (P1- G6PDH) e plastidiale (P2- G6PDH) che mostrano differenti parametri cinetici e giocano un differente ruolo nel metabolismo della pianta (Kruger e von Schaewen, 2003).

La presenza delle diverse isoforme è stata confermata dal punto di vista molecolare (Graeve et al., 1994; von Schaewen et al., 1995; Wendt et al., 2000), genomico (Wakao e Benning et al., 2005), e mediante Western-blotting con l'utilizzo di anticorpi specifici (Wendt et al., 2000; Esposito et al., 2005).

Alcuni studi hanno dimostrato in *Arabidopsis thaliana* la presenza di sei membri appartenenti alla famiglia dei geni G6PDH (tabella 1.1) (Wakao e Benning, 2005), ma solo cinque geni codificano per una proteina attiva; di queste sei differenti proteine quattro presentano il peptide di transito e sono quindi classificate come proteine plastidiali, mentre due hanno localizzazione citosolica. Queste isoforme presentano differenti caratteristiche biochimiche.

Group	Gene	Expression	Feedback inhibition	Reduction	In vivo activity ^a
Cy	<i>AtG6PD5</i>	Prevalent in leaf	$K_m \sim K_i$	Insensitive	Leaf and root
	<i>AtG6PD6</i>	Ubiquitous	ND	Insensitive	Ubiquitous except leaf
P1	<i>AtG6PD1</i>	Higher in developing organs Absent in root	$K_m < K_i$	Sensitive	ND
P2	<i>AtG6PD2</i>	Highest in root	$K_m > K_i$	Sensitive	ND
	<i>AtG6PD3</i>	Highest in root	$K_m \sim K_i$	Sensitive	Not detected
Other	<i>AtG6PD4</i>	Low	ND	ND	ND

Tabella 1.1: Schema riassuntivo delle caratteristiche delle sei diverse isoforme G6PDH isolate in *Arabidopsis thaliana*. Wakao e Benning, 2005

Ad esempio le due isoforme citosoliche (G6PD5, G6PD6) nonostante la loro somiglianza (92%) hanno caratteristiche differenti. L'analisi dell'attività e dei livelli di mRNA in vivo suggerisce che G6PD6 è l'isoforma citosolica principale di G6PDH in *Arabidopsis thaliana*. G6PD6 presenta parametri cinetici con valori maggiori di almeno un ordine di grandezza rispetto a quelle delle altre isoforme, suggerendo che in condizioni fisiologiche la G6PD6 è sub-saturata, e risponde linearmente alla variazione NADP^+ mentre l'attività specifica della isoforma citosolica G6PD5 non varia (Wakao e Benning, 2005).

Le due isoforme citosoliche sono differentemente espresse nei vari tessuti e stadi di sviluppo. L'isoforma G6PD6 risulta espressa costantemente in tutti i tessuti di *Arabidopsis thaliana* mentre l'isoforma G6PD5 è maggiormente espressa nel citosol di foglie, infatti negli altri tessuti la sua attività è molto bassa. Il ruolo specifico di G6PD5 nelle foglie non è chiaro, ma la sua tolleranza a ossidanti e riducenti, differentemente da G6PD6, potrebbe consentire a questa isoforma di svolgere funzioni esclusive nelle foglie (Wakao e Benning, 2005).

La G6PDH citosolica rappresenta la maggior parte dell'attività misurata (60-85%) ed è stato suggerito che queste isoforme siano coinvolte nel sostentamento del metabolismo basale (Esposito et al., 2001; 2005).

Le tre isoforme compartimentate, due plastidiali (G6PD2-G6PD3) ed una cloroplastica (G6PD1) si differenziano per localizzazione e sensibilità al potere riducente. Le due isoforme P2, simili fra loro nei livelli di espressione, nei parametri cinetici

e nella localizzazione (Wakao e Benning, 2005), sono maggiormente espresse nelle radici (Hong e Copeland, 1991; Esposito et al., 2001) invece l'isoforma P1 è espressa nei tessuti fotosintetici (Wendt et al., 2000) e durante lo sviluppo dei tessuti della pianta (Wakao e Benning, 2005); la P1-G6PDH può essere distinta dalla P2-G6PDH anche in base alla forte inattivazione in seguito all'azione di riducenti. Quest'ultima caratteristica è assente nell'isoforma citosolica (Anderson et al., 1974; Fickenscher e Scheibe, 1986; Esposito et al., 2001a).

L'attività G6PDH compartimentata rappresenta 15-20% del totale ed è probabilmente coinvolta nella risposta agli stress, al metabolismo azotato e ai processi di morfogenesi (Esposito et al., 2001; 2005).

1.2.1 Analisi filogenetica della G6PDH

L'analisi comparativa delle sequenze cDNA per la G6PDH di diverse piante, alghe, cianobatteri, funghi e animali ha permesso di costruire un albero filogenetico (figura 1.4) che identifica le varie "famiglie" di G6PDH note (Wendt et al. 1999).

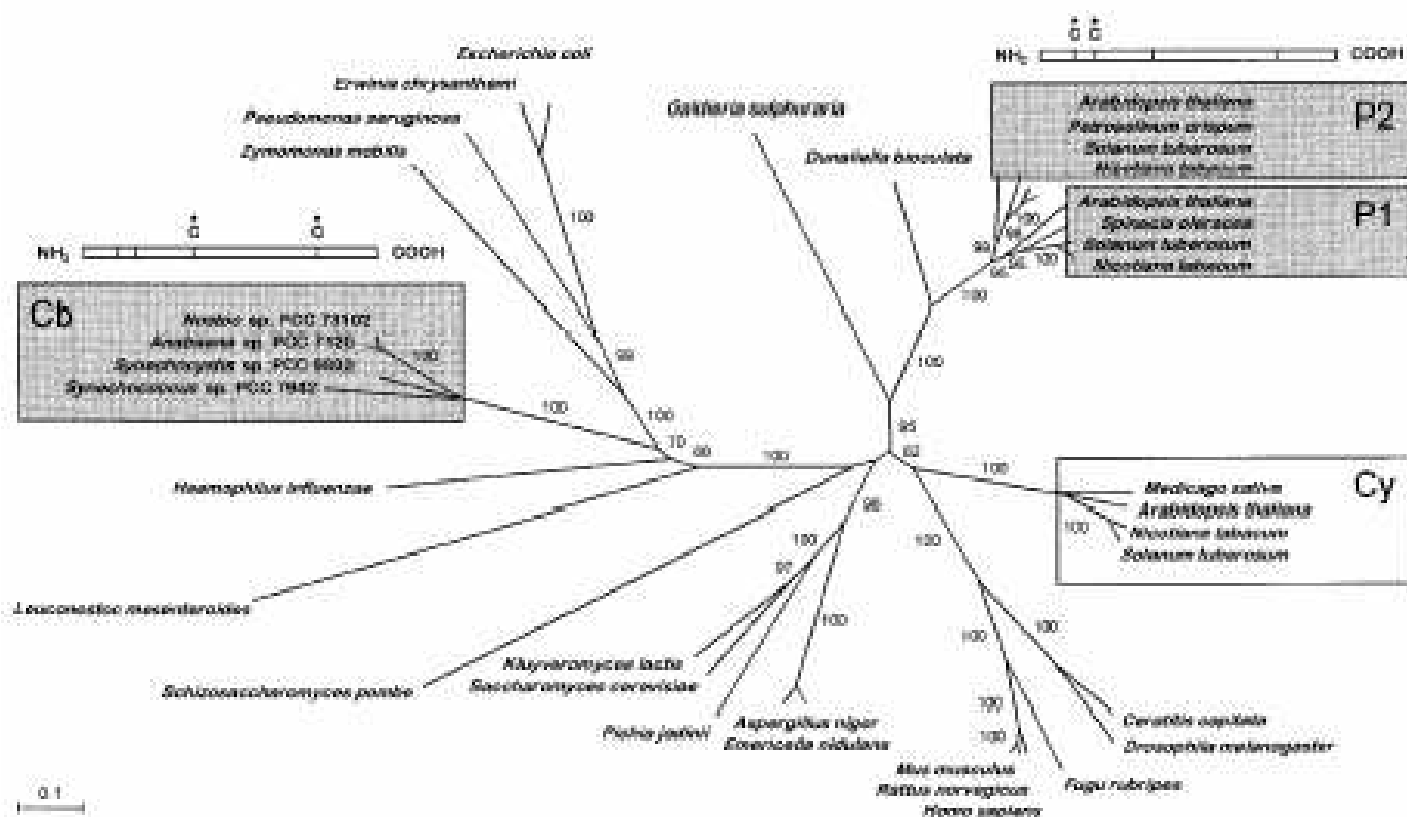


Figura 1.4: Albero filogenetico delle varie isoforme della G6PDH (da Wendt et al. 1999).

Negli archeobatteri il gene per la G6PDH non è presente, facendo presupporre una origine eubatterica del gene citosolico (Wendt et al. 1999).

Si può identificare un gruppo di enzimi presenti nei cianobatteri che si è evoluto in modo indipendente ed al quale sono simili le G6PDH degli eubatteri e funghi.

Sono presenti altri due rami principali: nel primo sono raccolte l'isoforma degli animali e quella citosolica delle piante superiori, nel secondo sono presenti le isoforme di alghe rosse, verdi e quelle plastidiali. Tra le sequenze plastidiali è presente un'ulteriore diramazione che divide le isoforme cloroplastiche (P1-G6PDH) e plastidiali (P2-G6PDH), entrambe codificate da geni nucleari, e caratterizzate da sei residui di cisteina localizzate tra l'N-terminale e la regione centrale della proteina, questi

residui formano ponti di solfuro ed alcune di esse sono coinvolte nella regolazione redox tipica di queste isoforme.

Nelle piante tutte le isoforme della G6PDH sono codificate dal DNA nucleare e mostrano una omologia di circa il 65%, maggiore rispetto all'omologia con la G6PDH dei cianobatteri (55%). Le isoforme delle G6PDH citosolica e plastidiale sono state sequenziate in diversi organismi vegetali. In particolare nelle foglie di tabacco le sequenze delle due isoforme contengono circa il 40% di identità ed il 28% di similitudine, facendo supporre una diversa origine filogenetica. Al contrario le sequenze amminoacidiche delle isoforme plastidiali di patata (*Solanum tuberosum*) e tabacco (*Nicotiana tabacum*) presentano oltre il 90% di identità; la sequenza amminoacidica dell'isoforma plastidiale da tabacco risulta essere simile per il 64% alla sequenza del batterio *Anabaena cylindrica*, facendo supporre il trasferimento ancestrale del gene dal plastidio al nucleo. Sia le G6PDH cianobatteriche che le isoforme cloroplastiche si differenziano dalla G6PDH citosolica per la sensibilità al potere riducente.

La sequenza genomica della G6PDH è stata sequenziata solo per l'isoforma plastidiale di *Nicotiana tabacum* ed è organizzata in 10 esoni (41.6% G+C) e 9 introni (34% G+C), cosicché la proteina completa consiste di 593 amminoacidi ed inoltre nella regione 5' sono stati individuati importanti elementi promotori responsabili del controllo dell'espressione del gene; tra questi, è possibile identificare NIT2, tipica di geni regolati dall'azoto, ed una sequenza consenso HSF sito di legame di fattori per la risposta

allo shock termico (Knight ed Emes, 2001). L'analisi della regione 5'-UTR dell'isoforma citosolica in patata mostra invece la presenza di elementi SURE, responsabili della regolazione da zuccheri (Hauschild e von Shaewen, 2003) e l'assenza del peptide di transito a conferma della permanenza della proteina nel citosol (Graeve et al., 1994).

L'analisi genomica mediante Southern blotting nella patata ha rivelato che l'enzima plastidiale è codificato da una famiglia di geni a singola copia, mentre l'isoforma citosolica è codificata da una famiglia genica con basso numero di copie. I sei residui di cisteine presenti nell'isoforma plastidiale sono confinati alla estremità N-terminale: alcuni tra questi residui sono responsabili delle modificazioni redox che possono indurre la formazione di ponti disolfuro intramolecolari.

1.2.2 Regolazione da parte del rapporto NADPH/NADP⁺

Il NADPH è un inibitore di tipo competitivo in tutte le isoforme G6PDH vegetali finora studiate (Scheibe et al., 1989; Hong e Copeland, 1991; Knight et al., 1999; Wendt et al., 2000).

Il NADPH potrebbe interagire con il sito di legame del NADP⁺, rendendolo meno disponibile per il substrato. Tale ipotesi è sostenuta dal fatto che quest'ultimo può essere rimosso dal sito con aggiunta di NADP⁺, infatti l'effetto inibitorio aumenta durante l'esposizione alla luce, quando aumenta il rapporto NADPH/NADP⁺ (Esposito et al., 2001; Lendzian e Bassham, 1975).

Bisogna sottolineare che, almeno nella G6PDH umana, è stato descritto un secondo sito di legame per il NADP^+ , che riveste un ruolo fondamentale nella transizione monomero (inattivo) – dimerico (attivo) (Shannon et al., 2000) e che è coinvolto nella stabilità a lungo termine del tetramero attivo (Wang et al., 2008).

In vivo il rapporto $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ si riduce durante i processi biosintetici o nella conversione di ossalacetato a malato da parte della malico deidrogenasi NADP^+ -dipendente (Huppe e Turpin, 1994) e durante processi come l'ossidazione del NADPH nella catena respiratoria, l'ossidazione durante la biosintesi degli acidi grassi e di composti isoprenoidi come carotenoidi e steroli. Quindi il processo dell'OPPP viene regolato secondo un processo a feedback-negativo dallo stesso NADPH che, come prodotto, agisce da inibitore.

1.2.3 Isoforme plastidiali della G6PDH e regolazione redox

Le isoforme compartimentate sono state studiate in molte piante superiori come patata (Wendt et al., 2000), riso (Huang et al., 2002), mais (Nemoto e Sasakuma, 2000) e orzo (Esposito et al., 2005); entrambe le isoforme hanno un ruolo fondamentale nella produzione di potere riducente, e nella riduzione del nitrato (Emes e Fowler, 1983; Oji et al., 1985; Bowsher et al., 1989), la sintesi di glutammato (Bowsher et al., 1992, Esposito et al., 2003) e nella biosintesi degli acidi grassi (Hutchings et al., 2005).

È noto che l'isoforma P1 è inibita alla luce per assicurare un efficiente ciclo di Calvin (Kruger e von Schaewen, 2003) e al buio è attivata per la produzione di equivalenti riducenti (Anderson et al., 1974; Lendzian, 1980; Wenderoth et al., 1997).

Quando piante intere o cloroplasti isolati vengono illuminati, l'attività della G6PDH è fortemente ridotta fino alla completa inibizione (Lendzian, 1980). Tale regolazione si rende necessaria nei cloroplasti per evitare un ciclo futile alla luce, durante il quale la CO₂ fissata dalla Rubisco nel ciclo di Calvin, possa essere di nuovo liberata dall'OPPP, dissipando l'ATP prodotto durante la fase luminosa fotosintetica; quindi è stato proposto che l'OPPP agirebbe solo di notte (von Schaewen et al., 1995) e nei plastidi non fotosintetici. Studi più recenti suggeriscono però che parte dell'OPPP potrebbe essere attivo anche alla luce durante i processi di assimilazione dell'azoto, utilizzando la fase ossidativa a partire dalla P2-G6PDH (Esposito et al., 2005).

L'inibizione della G6PDH indotta dalla luce può essere mimata incubando l'enzima con quantità crescenti di riducenti artificiali, come il ditiotreitolo (DTT).

La regolazione da parte della luce è dovuta *in vivo* al sistema ferroddossina-tiorodossina (Fd/Trx) (costituito da ferredossina, tiorodossina e ferredossina-tiorodossina reduttasi (FTR)); infatti è stato visto che la luce e il trasporto degli elettroni nei tilacoidi collegato al sistema Fd/Trx, hanno un effetto inibitorio sull'attività della P1-G6PDH: tale regolazione è dovuta alla presenza di due residui di cisteina (nella patata Cys₁₄₉ e Cys₁₅₇) localizzate all'N-terminale delle subunità dell'enzima G6PDH. Le

due cisteine sono localizzate in un loop esposto sulla superficie esterna della proteina e quindi facilmente accessibile per l'interazione con le tioredossine; la distanza fra i due gruppi di solfuro è di circa 0,4 nm la distanza teoricamente necessaria per la formazione di un ponte di solfuro (Wenderoth et al., 1997).

Le tioredossine sono delle piccole proteine redox che presentano allo stato ridotto dei gruppi $-SH$ ossidabili, che possono ridurre i sulfidrili di altre proteine; nota è la regolazione da parte delle tioredossine della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi NADPH-dipendente, il principale enzima regolato del ciclo di Calvin (fase oscura della fotosintesi), insieme alla rubisco (ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi-ossigenasi).

Le tioredossine hanno un peso molecolare di 12 KDa, presenti in tutte le cellule con un caratteristico motivo, costituito da 4 alfa-eliche circondate da 5 foglietti beta. Nelle piante sono state individuate almeno 19 differenti famiglie di tioredossine, distribuite in diversi compartimenti cellulari (Buchanan e Balmer, 2005).

Le tioredossine presentano sull'N-terminale due cisteine che formano un disolfuro che può essere ridotto dalla ferredossina nel compartimento cloroplastico; negli altri compartimenti cellulari questa riduzione avviene ad opera del NADPH e del TNR (Tioredossina-NADP⁺-Reduttasi). In pratica la ferredossina è l'accettore finale della catena di trasporto degli elettroni nel processo di fotosintesi: la clorofilla nel centro di reazione del fotosistema I (PSI), eccitata dalla luce, trasferisce elettroni alla ferredossina. Successivamente gli elettroni vengono ceduti alla

ferredossina-tioreddossina riduttasi, determinando la riduzione del legame disolfuro della tioreddossina; con un meccanismo simile, la tioreddossina regola una serie di enzimi modificando il loro stato redox (figura 1.5) (Gelhay et al., 2005).

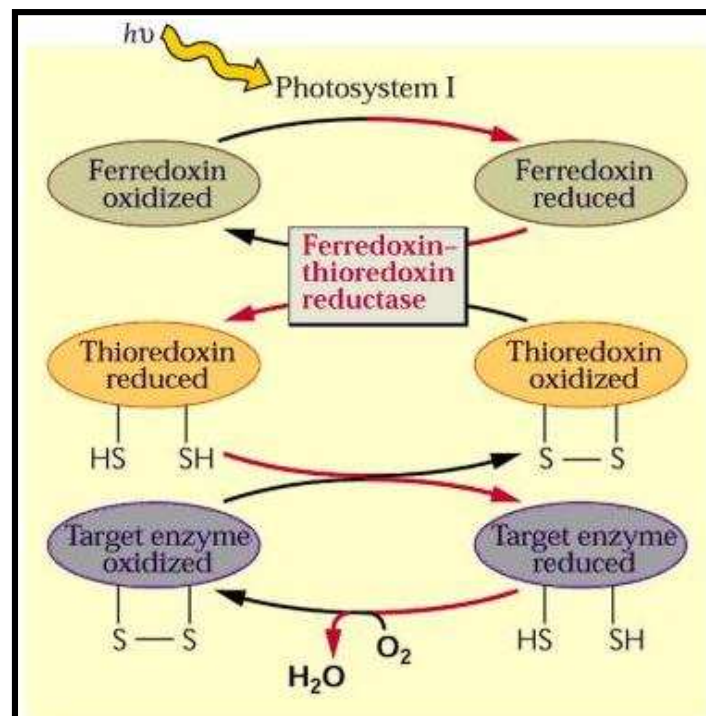


Figura 1.5: Schema del meccanismo di regolazione alla luce mediato dal sistema ferredossina/tioreddossina.

Nei cloroplasti le tioreddossine di tipo “f” sono coinvolte nella regolazione del ciclo di Calvin mentre le tioreddossine di tipo “m” interagiscono in maniera diretta con la G6PDH (Schürmann e Jacquot, 2000). Recentemente è stato dimostrato che l’isoforma P1-G6PDH di *Arabidopsis thaliana* può essere altrettanto efficientemente regolata dalle tioreddossine di tipo “f” (Neè et al., 2009).

Bisogna sottolineare che enzimi chimera formati dalla proteina citosolica con l’aggiunta dell’estremità N-terminale cloroplastica, contenente le cisteine regolatrici, non mostrano la regolazione redox dell’enzima compartimentato (Wendt et al., 2000). Questo

risultato suggerisce che esiste una struttura differente fra le due isoforme e che le due cisteine regolatrici (149 e 157) identificate sono necessarie ma non sufficienti per la regolazione redox della G6PDH (Wenderoth et al., 1997).

1.2.4 Isoforma citosolica della G6PDH e la regolazione “sugar-sensig”

Il meccanismo di regolazione mediato dagli zuccheri, detto “sugar sensing”, interviene agendo sulla attivazione di specifici geni, sulla traduzione, la stabilità proteica e l’attività enzimatica (Rolland et al., 2006).

Studi condotti sul promotore di G6PDH di patata rivelano la presenza di una regione al 5’-non tradotto di circa 2 kb caratterizzata dalla presenza di diversi motivi SURE (SUGar Responsive Element) (figura 1.6) che determinano una regolazione a livello trascrizionale del gene in relazione alle concentrazioni di zuccheri presenti nella cellula (Hauschild e von Schaewen, 2003).

La cyt-G6PDH è espressa costitutivamente molti tessuti (Hauschild e von Schaewen 2003); questa isoforma non sembra soggetta alla regolazione del sistema Fd/Trx, ma è regolato dai livelli di alcuni metaboliti. Infatti diversamente dall’isoforma plastidiale e cloroplastica, l’isoforma citosolica risulta scarsamente regolata dai cambiamenti del potere riducente (Fickenscher e Scheibe, 1986; Wenderoth et al., 1999), e da trattamenti con DTT (ditiotreitolo) (Esposito et al., 2001).

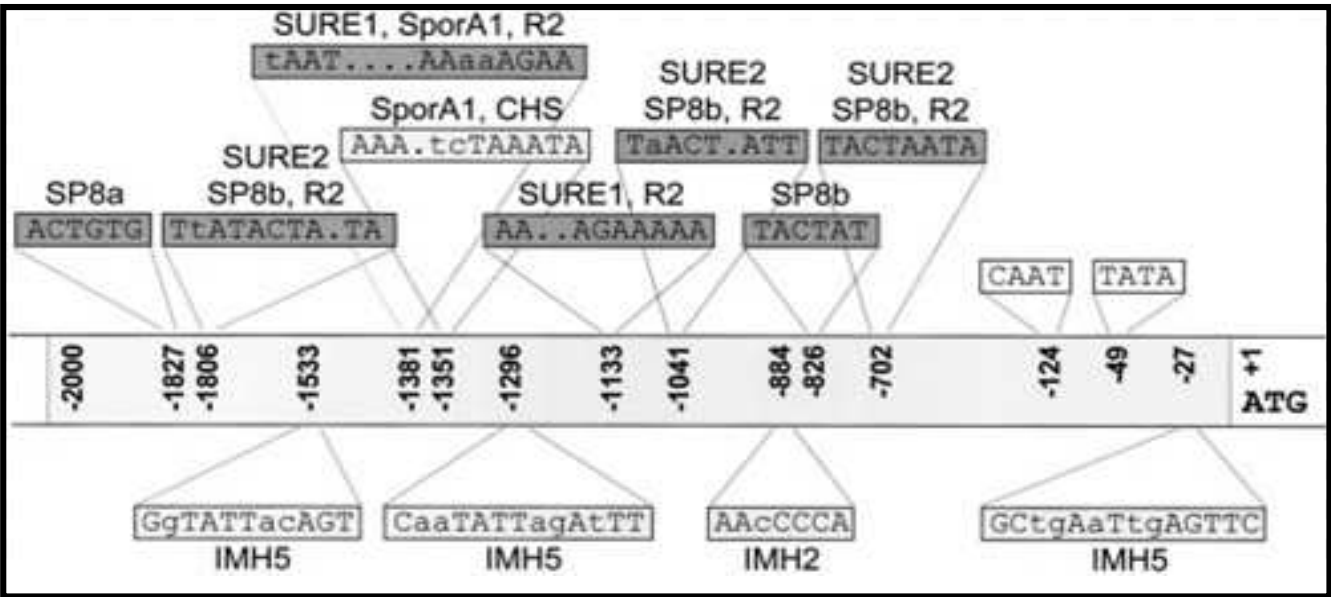


Figure 1.6. Schema della regione del promotore della cyt-G6PDH di patata. I motivi simili agli elementi di regolazione da zuccheri (SURE: sugar regulatory elements) individuate in altri geni vegetali sono indicate come di seguito: CHS, regione dei geni della calcone sintasi di *Petunia hybrida* e *Arabidopsis* IMH2 e IMH5, motivi omologhi nei promotori della isocitrato liasi e malato sintasi di *Cucumis sativus*. R2, sequenza ripetitiva dei promotori delle patatine di classe I di patata. SP8a e SP8b, sequenze di riconoscimento di una DNA-binding protein nei geni regolati da zuccheri sporamina e b-amylase di *Ipomoea batatas*. SporA1, regione ripetitiva regolata da zuccheri della Sporamin di *Ipomoea batatas* SURE1 e SURE2, elementi di risposta agli zuccheri 1 e 2 identificati in diversi geni di patata. CAAT e TATA box sono indicati. I numeri indicano la posizione a partire dal codone di inizio traduzione (ATG) (da Hauschild e von Schaewen, 2003).

Studi condotti sulle foglie di patata dimostrano che l'attività della cyt-G6PDH aumenta di 5-7 volte al buio in presenza di zuccheri quali fruttosio, saccarosio e glucosio. Tale aumento è paragonabile a quello misurato alla luce, determinato dalla produzione di zuccheri dovuto alla attività fotosintetica (Hauschild e von Schaewen, 2003).

L'attività della cyt-G6PDH non è regolata direttamente dalla luce, ma dagli zuccheri prodotti durante la fotosintesi. Infatti bloccando il traslocamento degli zuccheri nel citoplasma non

veniva osservato l'aumento né dei trascritti né dell'attività della cyt-G6PDH (Hauschild e von Schaewen, 2003).

Il modello proposto (figura 1.7) (Hauschild e von Schaewen, 2003) indica che l'accumulo di zuccheri nel citoplasma è percepito da un sensore di zuccheri intracellulare, che mediante un meccanismo a cascata che prevede l'intervento di proteine chinasi e fosfatasi per la trasduzione del segnale mediante eventi di fosforilazione e defosforilazione (Rolland et al., 2002) attiva fattori che legano le sequenze SURE sul promotore del gene cyt-G6PDH determinando l'aumento dei livelli di trascrizione e di conseguenza l'aumentata attività della proteina.

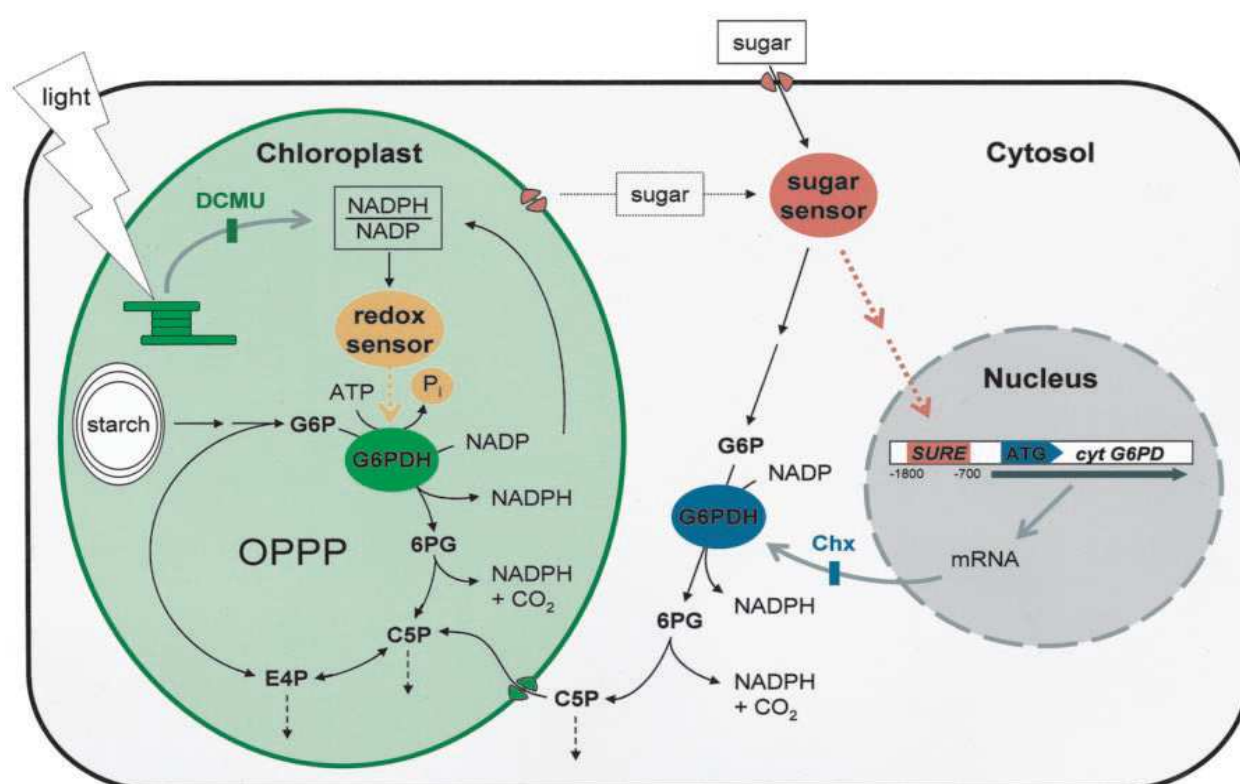


Figure 1.7: Modello della regolazione della G6PDH nel citosol e nei cloroplasti di foglie di patata.

"SURE" indica tutti gli elementi promotore identificati nel gene della G6PDH citosolica e coinvolta nella trasmissione del segnale mediata da zuccheri al nucleo, per chiarezza viene omessa la regolazione redox dell'enzima cloroplastico.

ATG: inizio di trascrizione; Chx: inibitore della traduzione della G6PDH citosolica ; DCMU: inibitore della catena di trasporto fotosintetica; C5P, C5 zuccheri fosfati; E4P: eritrosio-4P; 6PG: 6-fosfogluconato. (Hauschild e von Schaewen, 2003).

1.3 G6PDH e stress abiotici

Le piante sono esposte a molti tipi di stress abiotico, tra i quali la siccità, gli stress ossidativi, alte o basse temperature, la salinità; tutto questo provoca chiaramente una serie di danni morfologici e metabolici che determinano gravi effetti sulla produttività e sulla qualità dei prodotti agricoli. Si stima che soltanto il 10% della superficie coltivata nel mondo può essere classificata come non soggetta a stress, mentre il restante 90%, con diversa intensità, può essere soggetta a stress singoli o combinazioni di stress (Sharma e Lavanya, 2002), che causano un sostanziale calo della produzione agricola.

Le piante hanno sviluppato quindi una serie di strategie per rispondere a questi tipi di stress, per garantire la sopravvivenza dell'organismo stesso, tra le quali la modificazione del proprio ciclo vitale, così da evitare le avversità ambientali (ad esempio, le piante precoci sfuggono alla siccità estiva terminando il proprio ciclo vitale prima del sopraggiungere della stagione secca); la formazione di barriere morfologiche o fisiologiche (ad esempio, le piante chiudono gli stomi per evitare un'eccessiva traspirazione durante i periodi di siccità); ed infine l'attivazione di segnali molecolari per resistere ed adattarsi allo stress o per riparare i danni provocati dallo stress stesso.

E' stato dimostrato che la risposta agli stress, e la conseguente acquisizione di resistenza, sono associati alla relazione dell'espressione di molti geni in grado di determinare i cambiamenti metabolici necessari per l'adattamento alle nuove

condizioni (Cattivelli et al., 2002). La percezione di una situazione di stress viene percepita da uno specifico recettore che attiva una complessa rete di segnali metabolici che vengono trasdotti fino al nucleo, dando origine ad una appropriata risposta cellulare. Lo sviluppo della tolleranza allo stress è caratterizzato da chiari eventi molecolari e metabolici; la percezione delle variazioni dell'ambiente esterno da parte della cellula mediante recettori di membrana, la successiva trasduzione del segnale all'interno della cellula (accumulo transiente di ioni calcio, attivazione di proteine chinasi, accumulo di acido abscissico, accumulo di inositolo trifosfato); ed infine l'attivazione di fattori trascrizionali per l'induzione di geni di risposta allo stress per fronteggiare la situazione riparando o mantenendo l'omeostasi cellulare; non ultimi, sono attivati dei meccanismi di regolazione fotosintetica e protezione del cloroplasto dalla fotoinibizione.

La resistenza si manifesta dopo un periodo di acclimatemento, durante il quale la pianta, in risposta a livelli minimi di stress, attiva una riorganizzazione del metabolismo cellulare in modo da consentire alle cellule di sopravvivere in presenza di livelli di stress altrimenti letali.

Diversi studi dimostrano che esiste una correlazione tra il ciclo dell'OPPP e la risposta della pianta in condizioni di stress come carenza di nutrienti, siccità ed elevata salinità (Esposito et al., 2003; Nemoto e Sasakuma, 2000; Valderrama et al., 2006; Wang et al., 2008). Ad esempio è noto che l'acido abscissico (ABA), così come altri fitoregolatori quali acido jasmonico (Ja) e l'acido salicilico (SA), giocano un ruolo importante nella rete segnale

durante la risposta agli stress (Fujita et al., 2006), l'accumulo intracellulare di ABA, come segnale di stress, influenza la regolazione di una serie di geni. Tale regolazione genica è dovuta dalla presenza di sequenze di risposta all'ABA definite ABRE sui promotori dei geni interessati. Elementi ABRE sono stati trovati anche sul promotore dell'isoforma P2-G6PDH di riso (Hou et al., 2006), e anche in orzo si registra un aumento dell'attività e dell'accumulo della P2-G6PDH in seguito all'aggiunta di ABA (Cardi et al., 2010).

1.3.1 G6PDH e metabolismo azotato

L'azoto è il macronutriente più richiesto dalla pianta: nei vegetali l'azoto è presente oltre che negli amminoacidi (e quindi nelle proteine), negli acidi nucleici (DNA e RNA) e in molti altri composti come le clorofille; inoltre contengono azoto alcuni fitoregolatori (auxine e citochinine) e prodotti secondari come gli alcaloidi. Le piante possono assorbire ed assimilare fonti azotate sia inorganiche (come il nitrato, NO_3^- e l'ammonio, NH_4^+) che organiche (come l'urea), ma la maggior parte degli organismi vegetali utilizza preferenzialmente il nitrato presente nel terreno. Una volta assorbito a livello radicale mediante specifici trasportatori, il nitrato subisce due riduzioni successive che portano alla formazione di ammonio. Le reazioni sono catalizzate da due enzimi, la nitrato reduttasi (NR) e la nitrito reduttasi (NiR). I due sistemi enzimatici hanno rispettivamente localizzazione citosolica e plastidiale: la NR, utilizzando NADH,

riduce il nitrato a ione nitrito (NO_2^-) il quale viene ridotto dalla NiR in ammonio, utilizzando la ferredossina come donatore di elettroni. L'assimilazione dell'ammonio negli scheletri carboniosi avviene attraverso l'azione concertata di due enzimi, la glutammina sintetasi (GS)) e la glutammato sintasi (GOGAT, glutammina α -chetoglutarato amminotransferasi), che porta alla sintesi netta di una molecola di acido glutammico a partire da ammonio e acido 2-chetoglutarico, attraverso la formazione di glutammina. Il complesso di reazioni viene comunemente denominato ciclo GS/GOGAT (Lea e Miflin, 2003). La glutammina sintetasi catalizza la prima tappa dell'organizzazione dell'ammonio, formando glutammina a partire da glutammato con l'idrolisi concomitante di ATP e presenza di magnesio. La GOGAT catalizza il trasferimento del gruppo ammidico della glutammina alla posizione α -cheto del 2-chetoglutarato, dando così luogo alla sintesi di due molecole di glutammato (Lea e Miflin, 2003). Il ciclo GS/GOGAT riveste inoltre un ruolo cruciale nella riassimilazione dell'ammonio rilasciato dal processo fotorespiratorio (Lam et al., 1996).

Durante l'assimilazione dell'azoto l'attività del ciclo dell'OPPP aumenta per sopperire alla maggiore richiesta di potere riducente per la riduzione del nitrato e del nitrito (Emes e Fowler, 1983; Bowsher et al., 1989) e per le reazioni del ciclo GS-GOGAT (Bowsher et al., 1992; Esposito et al., 2003).

L'aumento nell'attività della G6PDH sembra dovuto alla variazione dei livelli di glutammina nelle radici (Esposito et al., 2001b). L'incremento dell'attività del ciclo dell'OPPP è

determinato maggiormente dall'isoforma plastidiale P2-G6PDH, sul cui promotore è stata individuata una sequenza NIT2 responsabile della regolazione da parte dell'azoto (Knight et al., 2001), ma in parte anche dall'aumento dell'isoforma citosolica (Esposito et al., 2005).

Studi effettuati su plastidi isolati (Bowsher et al., 1992; Esposito et al., 2003) dimostrano che oltre a fornire il potere riducente necessario per la riduzione del nitrato, per la biosintesi degli acidi grassi e per quella degli amminoacidi, il ciclo OPPP produce gli equivalenti di riduzione indispensabili per la sintesi di glutammato: la reazione catalizzata dalla GOGAT nei tessuti non fotosintetici necessita della OPPP come fonte di potere riducente, essendo assente la via fotosintetica.

1.4 G6PDH e stress biotico

Le piante sono costantemente sottoposte ad attacchi causati da organismi viventi quali funghi, batteri, nematodi, insetti, erbivori. Tale stress biotico, pur causando danni più o meno evidenti alla pianta, per lo più non determina lo sviluppo di una malattia.

Le piante hanno sviluppato infatti una elevata capacità di resistenza ai patogeni, per cui l'occorrenza dell'infezione è considerata una eccezione. Tale incapacità da parte del patogeno è determinata da diversi livelli di difesa della pianta. Le piante possono presentare barriere strutturali, come ad esempio l'ispessimento della parete, stomi con scarsa apertura, la

presenza di spine, oppure presentano barriere tossiche (Hammond-Kosack e Jones, 1997) in grado ad esempio di indurre la produzione di specie reattive dell'O₂ al fine di determinare la cosiddetta risposta ipersensibile (HR) che in ultimo porta alla morte programmata delle cellule (programmed cell death – PCD), al fine di limitare l'infezione (Scheideler et al., 2002). I meccanismi più sofisticati determinano il riconoscimento del patogeno e l'attivazione di meccanismi di difesa complessi e strutturati che prevedono il coinvolgimento di geni di resistenza (geni R) (Hammond-Kosack e Jones, 1997).

La parete della cellula vegetale rappresenta una delle prime barriere costitutive all'aggressione dei patogeni, che in molti casi riescono a degradarla con enzimi specifici come pectinasi, cellulasi, xilanasi e poligalatturonasi. Le piante possono rispondere all'infezione in corso fortificando la parete cellulare rendendola così più resistente alla degradazione enzimatica e, di conseguenza, ostacolare l'avvio della patogenesi e bloccare la diffusione dei nutrienti dalla cellula vegetale nell'apoplasto a vantaggio del microrganismo; oltre ai nutrienti, la parete più spesso ritarda la diffusione di sostanze fitotossiche dal patogeno alla pianta, fattore che può avere un ruolo essenziale per le patogenesi avviate da patogeni necrotrofi o tossigenici (Lusso e Kuc, 1999).

Un ruolo centrale nella difesa è svolto da fitoregolatori come l'acido jasmonico (JA), l'acido salicilico (SA) e l'etilene (ET) che fungono da molecole segnale per l'attivazione dei vari meccanismi di difesa.

Le interazioni tra organismi patogeni e piante ospiti sono regolate dal grado di variabilità genetica presente nelle loro popolazioni; ma anche piccole variazioni ambientali, come la temperatura e lo stato nutrizionale della pianta possono avere effetto sullo sviluppo dei meccanismi di difesa, attenuando la resistenza e promuovendo il progredire dell'infezione (Fujita et al., 2006). Inoltre, lo stadio di accrescimento può influenzare la resistenza o la suscettibilità ad un dato patogeno (Ellingboe, 2001).

Quando le risposte di difesa attivate, cioè quelle che modificano lo stato fisiologico della pianta attraverso una serie di eventi metabolici per fronteggiare l'invasore, sono in grado di bloccare il patogeno, le interazioni pianta-patogeno vengono definite omologhe incompatibili (Hutcheson, 1998) e la pianta è detta resistente; quando invece la pianta si ammala a seguito di patogenesi, si parla di interazioni omologhe compatibili, e la pianta è detta suscettibile. Comunque, il potenziale genetico per la creazione delle barriere di difesa è comune sia alle piante resistenti che a quelle suscettibili: la differente risposta sembra essere collegata alla rapidità ed alla consistenza della reazione.

Il riconoscimento di un organismo patogeno da parte di una cellula vegetale avviene attraverso una vasta gamma di risposte di difesa, quali la produzione di composti antimicrobici, di specie attivate dell'ossigeno (activated oxygen species, AOS), o di specie attive dell'azoto (nitric oxide species, NOS). Lo scoppio ossidativo (oxidative burst) causato dall'attacco dei patogeni può essere considerato un precoce meccanismo di difesa ed un

sistema generatore di segnali per l'attivazione delle successive fasi della resistenza (Dixon *et al.*, 1994).

I processi ossidativi hanno funzioni multiple nella risposta di difesa della pianta: inizialmente, pochi minuti dopo l'infezione, essi provvedono alla necessaria quantità di H_2O_2 per formare i ponti intermolecolari tra proteine della parete cellulare, attraverso reazioni catalizzate da perossidasi. Inoltre, l'aumento del livello di H_2O_2 , funge da messaggero secondario per stimolare ulteriori risposte difensive della pianta. Infine, l'aumento dei livelli di ROS (specie reattive dell'ossigeno) oltre una determinata soglia critica, innesca nella cellula vegetale il processo di morte cellulare programmata, determinata dalla risposta HR (Levine *et al.*, 1999).

Superata da parte del patogeno la risposta aspecifica della cellula condizione necessaria perché la malattia non si manifesti è il riconoscimento tra la pianta e il patogeno stesso. L'interazione avviene tra i geni R della pianta e i geni di virulenza del patogeno (AVR), che sono quelli che codificano per gli elicitori, in genere molecole relativamente semplici: se la pianta possiede un corrispondente gene R, avviene l'interazione R-AVR, la malattia non si sviluppa, e la pianta è definita resistente. Nel caso in cui i geni R della pianta non sono in grado di riconoscere l'elicitore prodotto dal gene AVR del patogeno, tale interazione non avviene, la pianta è definita suscettibile e quindi manifesta la malattia.

I geni R della pianta codificano per recettori che riconoscono e legano l'elicitore; gli elicitori possono essere proteine, peptidi,

lipidi e frammenti provenienti dalla membrana esterna o dalla parete del patogeno; l'analisi delle sequenze di diverse proteine R ha rivelato l'esistenza di motivi condivisi che si ricombinano in maniera differente, tra cui ricordiamo domini di interazione e/o riconoscimento proteico quali LRR (leucine-rich repeat), domini con attività chinasi, domini CC (coiled-coil), il sito NB (nucleotide-binding) e il dominio TIR che presenta omologia con domini simili al recettore per l'interleuchina-1 dei mammiferi (Toyoda et al., 2002).

Se il patogeno presenta un gene *avr* il cui prodotto non viene riconosciuto dalla pianta, o se la pianta non ha il gene R corrispondente, la presenza del patogeno sarà rilevata troppo tardi per una risposta efficace e si verificherà l'infezione e la conseguente manifestazione della malattia. Tanto più rapido è il riconoscimento R-AVR tanto più efficace sarà la difesa della pianta.

In seguito ad una prima infezione, la pianta sviluppa una resistenza superiore nel caso di un secondo attacco. Tale meccanismo è definito resistenza acquisita sistemica (Systemic Acquired Resistance - SAR). La SAR in pratica è innescata dalla necrosi indotta dal patogeno causata da un'interazione incompatibile tra patogeno e ospite; oppure dall'azione del patogeno in una reazione compatibile. In poche ore dalla necrosi localizzata, la pianta comincia ad esprimere numerosi geni, spesso indicati come "geni SAR" e attiva pathway metabolici di sintesi di svariati prodotti antimicrobici (es. fitoalessine), e produce proteine di difesa, incluse le proteine PR, sia

localmente, nel punto di infezione, sia sistemicamente in tutto il resto della pianta. Queste proteine PR sono di origine vegetale e sono associate a situazioni di stress sia biotici che abiotici; è interessante notare che esse si accumulano non solo localmente nella zona infetta o danneggiata, ma la loro produzione è generalizzata a tutta la pianta.

La resistenza SAR è aspecifica, ma si manifesta nei confronti di un ampio spettro di patogeni, inizialmente comprendendo solo l'area prossima al sito di infezione (resistenza localizzata acquisita - LAR), per poi estendersi, nell'arco di pochi giorni, a tutta la pianta. Il meccanismo non è stato del tutto chiarito ma un ruolo fondamentale è svolto dall'acido salicilico, la cui concentrazione aumenta nelle zone di infezione e determina induzione del sistema SAR (Chamnonpolg et al., 1998). In una prima fase, precedente alla formazioni di lesioni necrotiche, si ha l'accumulo transiente e limitato di SA, mentre in una seconda fase, la produzione di SA raggiunge livelli più alti e dura più a lungo nel tempo. Ciò suggerisce un coinvolgimento di SA anche nell'attivazione del programma di morte cellulare (Mur et al., 2000).

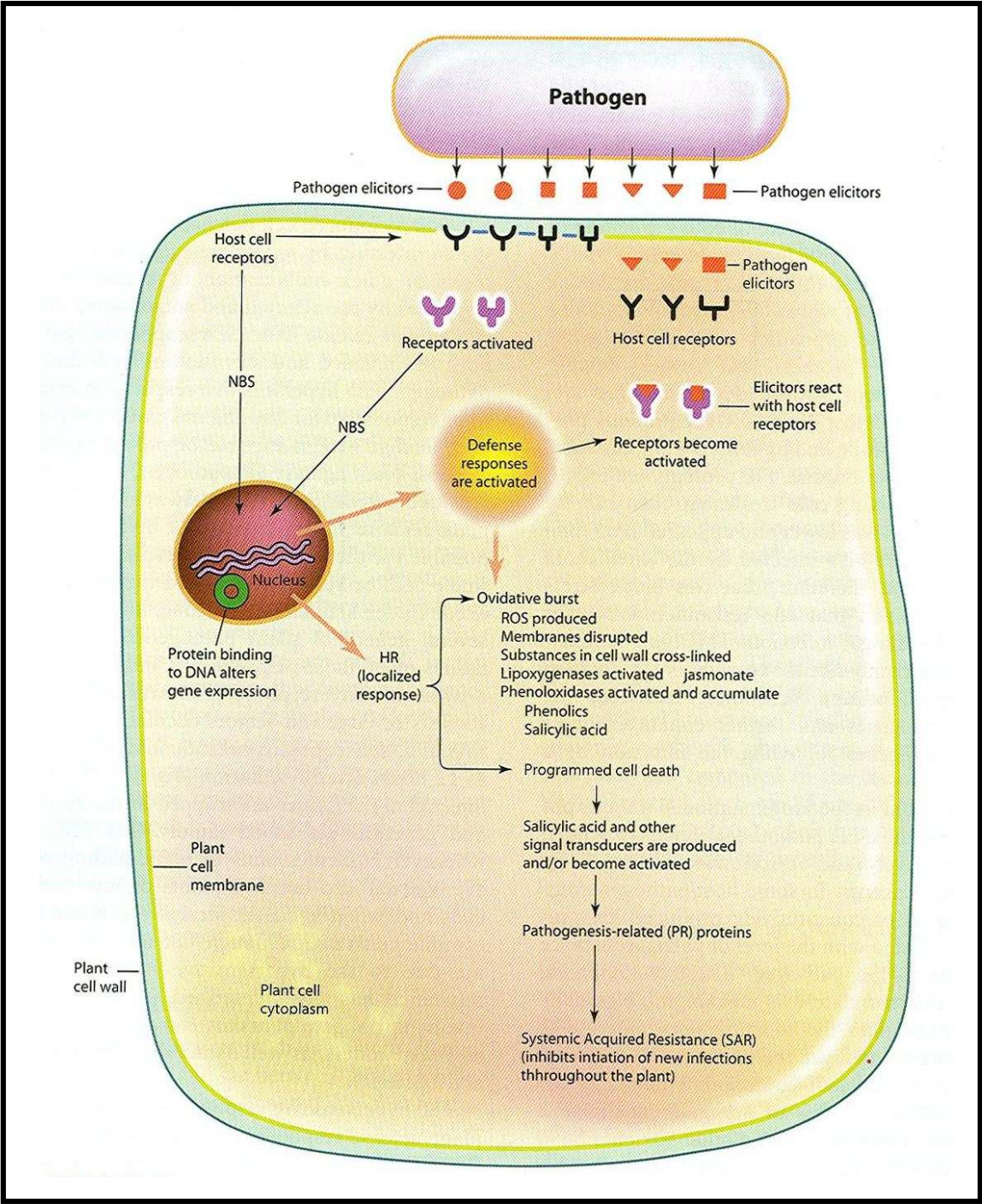


Figura 1.8: Schema delle risposte di difesa attivate nella cellula vegetale in seguito ad attacco patogeno.

I meccanismi di difesa in seguito all'attacco del patogeno sono associati ad un incremento della richiesta energetica, di equivalenti riducenti e di scheletri carboniosi per la sintesi di molecole necessarie alla difesa.

Questo supplemento energetico può essere garantito dall'incremento nell'attività dell'OPPP e della respirazione (Sheideler et al., 2002): l'attività della G6PDH aumenta del 40% un'ora dopo l'infezione, con un picco massimo tra le 6 e le 10 ore successive (Sharte et al., 2005).

Dopo le prime ore dall'infezione, la formazione dei calli è accoppiato all'accumulo di ROS e di carboidrati nel sito d'attacco. Si verifica un aumento dei livelli di saccarosio, seguito da una maggiore attività dell'enzima invertasi apoplastica; il fruttosio e il glucosio così prodotti fungono da substrati per la respirazione e l'OPPP, mentre si osserva un declino nell'attività fotosintetica.

Il coinvolgimento dell'OPPP nei meccanismi di difesa è stato anche confermato dalla maggiore necessità da parte della cellula di E4P per rifornire il metabolismo della'acido schichimato (Herrmann e Weaver, 1999); ed inoltre le reazioni dell'OPPP garantiscono la formazione e il mantenimento delle specie reattive dell'O₂ che necessitano di una grande quantità di NADPH fornita proprio dall'attività della OPPP (Pugin et al., 1997; Scharte et al., 2005).

1.4.1 L'orzo (*Hordeum vulgare*) e *Blumeria graminis* sp. *hordei*

L'orzo è uno dei cereali maggiormente impiegati dall'uomo per l'alimentazione, e infatti, dato il suo utilizzo, è la quarta graminacea coltivata dopo riso, grano e mais.

Originario dell'Asia occidentale e dell'Africa nord orientale, la sua coltura si è diffusa in tutta Europa ed in tutto il mondo.

L'orzo è una pianta erbacea annuale, rispetto ad altri cereali presenta una buona resistenza alla siccità e può sopportare temperature di 38 °C se l'umidità ambientale non è troppo elevata. Per quanto riguarda l'altitudine può essere coltivato dal livello del mare fino ai 4500 m. Resiste molto bene alla salinità del suolo, tollera il freddo ma ha una bassa capacità di competere per la luce. L'orzo germina ad una temperatura minima di 5 °C, la temperatura ottimale per la crescita è di 15 °C, mentre 17 – 18 °C sono idonei per la fioritura.

Come tutte le piante l'orzo è soggetto all'attacco di numerosi patogeni tra cui *Blumeria graminis* sp. *hordei* (Bgh).

Blumeria graminis è un fungo molto comune che determina una grave patologia in tutte le graminacee, comunemente detta muffa bianca o mal bianco.

Questa patologia attacchisce principalmente in primavera, nelle fasi di levata e spigatura e può causare pesanti effetti sulle coltivazioni delle graminacee. Infatti in caso di gravi epidemie si possono avere perdite di produzione del 30% oltre ad un peggioramento qualitativo della granella.

Per combattere tale patogeno sono presenti sul mercato molti antifungini ma comunque numerosi sono gli studi per comprendere tecniche molecolari per migliorare la resistenza delle diverse cultivar di cereali.

Blumeria graminis è un patogeno obbligato, per la maggior parte del suo ciclo di vita è nella forma aploide, mentre le conadi, forma asessuata, rappresentano la forma principale per la moltiplicazione e la distribuzione. Bgh può attaccare tutte le parti epigee della pianta, ma normalmente si sviluppa sulla pagina superiore delle foglie.

Il ciclo di vita asessuato inizia con la formazione di conidiospore sulla superficie delle foglie, mediante l'appressorio il fungo aderisce alla foglia in seguito si ha la formazione del tubulo germinativo che perfora la cuticola vegetale e penetra nei tessuti sottostanti, dove vengono differenziati gli austori che permettono l'assorbimento di sostanze nutritive (Figura 1.9).

Il fungo inizialmente si manifesta come piccole macchie puntiformi, che poi evolvono fino a formare una muffa di consistenza soffice e di colore bianco – grigiastro. I tessuti attorno alle aree colpite assumono una colorazione brunastra e necrotizzano.

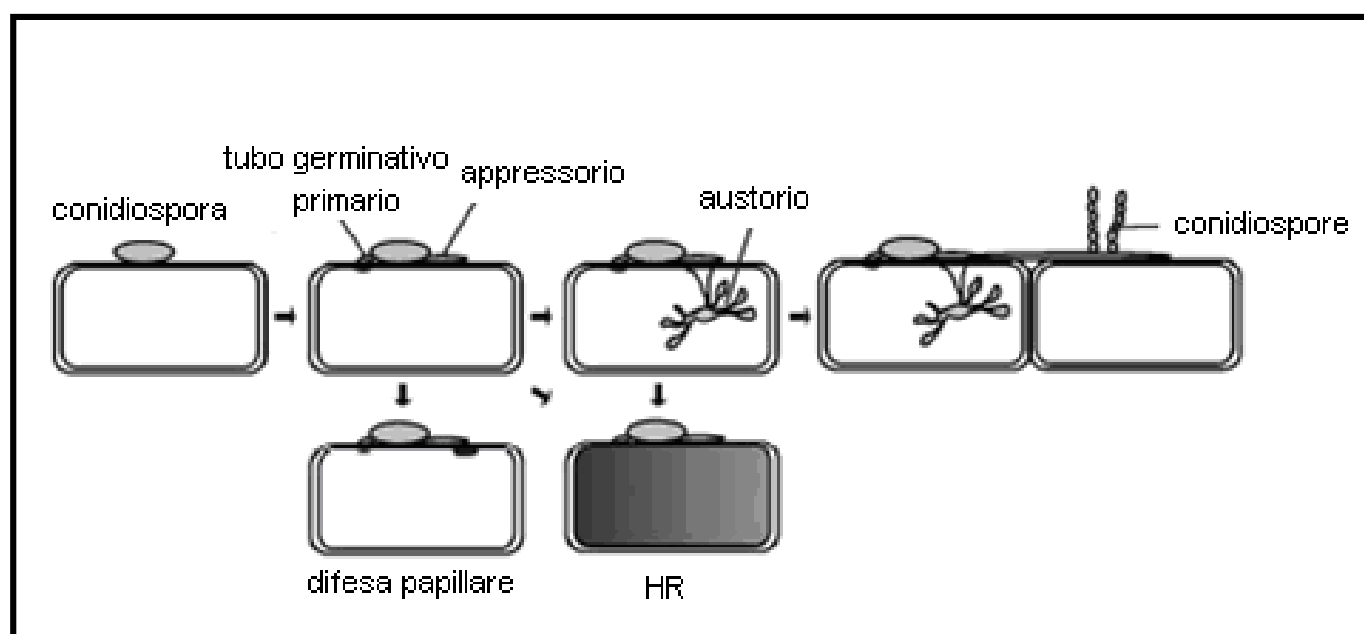


Figura 1.9. Ciclo asexuale di *Blumeria graminis*: la prima conidiospora aploide sviluppa il tubo germinativo, poi un appressorio il quale penetra nelle cellule epidermiche della cellula ospite. In fine si sviluppano le nuove conidiospore. Ci sono due meccanismi di difesa: bloccare l'ingresso del patogeno o avviare la risposta HR.

1.4.2 Geni resistenza nell' orzo

L'orzo è un organismo diploide con un genoma di 5000 Mb organizzato in sette coppie cromosomiche e non ancora del tutto sequenziato, sul cromosoma 1H è stato identificato un locus genico, definito MLA (mildew locus a), deputato alla resistenza nella difesa da patogeno. Il locus MLA contiene numerosi alleli che codificano per proteine ad alta specificità contro gli effettori patogeni. Tali proteine presentano tutte le caratteristiche note dei geni resistenza R, la regione maggiormente polimorfica è la regione al C-terminale ricca in leucine deputata al riconoscimento.

Per migliorare la resistenza delle piante nei confronti di Bgh sono state create linee isogeniche introgressate con differenti alleli MLA. Le linee trasgeniche ottenute a seconda dell'allele MLA esogeno che hanno incorporato nel loro genoma presentano differente livello di resistenza ai diversi isolati del fungo.

Sono stati individuati e caratterizzati più di 30 differenti alleli MLA che conferiscono specifica resistenza ai diversi ceppi fungini.

Oltre ai geni MLA sono stati individuati altri 5 loci genici sul cromosoma 1H coinvolti nella resistenza contro il mal bianco: MLAT, MIGa, Mlnn, Mlra e MLK (Jorgensen, 1994). Finora, solo MLO è stato clonato e caratterizzato; e MLO sembra essere una proteina transmembrana, e potrebbe svolgere un ruolo nella traffico vescicolare coinvolti nella difesa.

1.5 Scopo del progetto di dottorato

Lo scopo di questo progetto di ricerca è lo studio dell'isoforma citosolica dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi di piante d'orzo (*Hordeum vulgare* cv *Nure*).

Lo studio dell'isoforma cyt-G6PDH presenta interessanti risvolti scientifici, poiché la descrizione dettagliata delle caratteristiche di questo enzima potrebbe chiarire i suoi ruoli nei processi metabolici di base, e nella risposta delle piante agli stress. Data la posizione nodale che la OPPP assume nella crescita e nel differenziamento delle piante superiori, questo progetto potrebbe avere importanti applicazioni al fine di migliorare la qualità e la resa dei raccolti .

In questo lavoro gli obiettivi principali sono la caratterizzazione molecolare e biochimica di tale isoforma e l'indagine di alcuni dei possibili meccanismi che regolano la sua espressione e attività.

I punti fondamentali di questo progetto sono:

- L'isolamento della sequenza codificante l'enzima cyt-G6PDH.
- L'ottenimento di una proteina ricombinante cyt-G6PDH funzionale e stabile.
- Lo studio della regolazione di questo enzima, in particolare:
 - La variazione dei livelli di attività della cyt-G6PDH in presenza di zuccheri (sugar sensing).
 - I cambiamenti nei livelli di trascritti della cyt-G6PDH in seguito ad attacco da parte del patogeno *Blumeria graminis* sp. *hordei*.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Organismo e condizioni di coltura

I semi d'orzo (*Hordeum vulgare* L., var. Nure) sono stati forniti dall'Istituto Sperimentale di Cerealicoltura di Fiorenzuola d'Arda (PC) e conservati alla temperatura di 4°C. Essi venivano lasciati ad imbibire in acqua per 60 minuti e poi messi a germinare al buio alla temperatura di 21°C, su carta da filtro imbevuta di acqua deionizzata. Dopo 5 giorni, a germinazione avvenuta, le piantine venivano rimosse e poste in coltura idroponica su un terreno modificato di tipo Long Ashton, avente la seguente composizione: K_2HPO_4 1 mM; KH_2PO_4 1 mM; CaCl_2 1 mM; K_2SO_4 1.25 mM; MgCl_2 1 mM; FeSO_4 -EDTA 3.5 mg /L.

La soluzione di oligoelementi (1ml/litro) aveva la seguente composizione: KCl 2.5 mM; H_3BO_3 1.25 mM; CuSO_4 0.025 mM; MnSO_4 0.25 mM.

Le piante venivano illuminate con un flusso di fotoni di $300 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ e sottoposte ad un fotoperiodo di 16 h di luce/8 h di buio, in una camera termoregolata a 24 °C con il 50% di umidità relativa.

2.1.1 Esperimenti sullo sugar sensing

Dopo 3 giorni di crescita in idrocultura come descritto in precedenza, le piante venivano divise in due vasche separate contenente terreno liquido a cui veniva aggiunta una fonte azotata (10 mM KNO₃), una vasca era considerata di controllo, mentre alle piante campione veniva aggiunto 50 mM fruttosio. In entrambe le vasche al terreno erano aggiunti un antibatterico (penicillina) e un antifungino (streptomicina) (Sigma, P0781), per evitare la crescita di organismi eterotrofi nel terreno liquido in presenza di zuccheri.

I prelievi di foglie e radici erano effettuati subito prima e dopo 6-24-48-72 ore dell'aggiunta di fruttosio; prelievi paralleli erano effettuati sulle piante di controllo.

2.2 Estrazione dell'RNA

Campioni di 100 mg di radici e foglie di orzo veniva polverizzati in azoto liquido utilizzando un mortaio ed un pestello, l' RNA veniva estratto utilizzando il Trizol Reagent (Invitrogen) in accordo con il manuale d'istruzione. I campioni ottenuti erano risospesi in H₂O - DEPC (diethyl pyrocarbonate) e conservati a -80°C. L'integrità e la concentrazione dell'RNA erano stimate mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% e lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nM (Nanodrop 1000 spectrophotometer; Thermo Scientific) per quantificare la concentrazione di RNA e stimare eventuali contaminazioni da fenoli e proteine.

Il cDNA era sintetizzato a partire dai campioni di RNA utilizzando il sistema di RT-PCR ThermoScript™ (Invitrogen).

La reazione di retrotrascrizione era allestita secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice utilizzando 4 µg di RNA. I campioni venivano trasferiti in un termociclatore preriscaldato e sottoposti ad un ciclo di sintesi: 50°C per 60 minuti; 85°C per 5 min.

2.2.1 Disegno dei primers

La sequenza nucleotidica della G6PDH citosolica di *Hordeum vulgare* non era conosciuta all'inizio di questo progetto, quindi in una prima fase sono stati disegnati dei primers degenerati, basandosi sulle regioni più conservate del gene della glucosio-6-fosfato-deidrogenasi, identificate mediante un allineamento multiplo tra sequenze proteiche della G6PDH citosolica di alcuni organismi vegetali presenti in Gene Bank: *Solanum tuberosum* (Accession number: X74421, X83923, AJ010712) (Graeve et al., 1994; von Schaewen et al., 1995; Wendt et al., 1999); *Nicotiana tabacum* (Accession number: AJ001770, X99405, AJ001772) (Knight and Emes, 1996; Wendt et al., 1999); *Arabidopsis thaliana* (Accession number: ATJ00135, AJ010970) (Wendt et al., 1999).

La sequenza ottenuta mediante amplificazione del cDNA con i primers degenerati era identificata e mostrava un'identità del 100% con una sequenza EST non caratterizzata di *Hordeum vulgare* (cv *Haruna nijo*) presente in banca dati (AK249122) (Sato

et al., 2007), sulla base di questa sequenza venivano disegnati primers sequenza specifici con l’ausilio del software “GENE JOKEY” .

I primers utilizzati durante l’esperimento di Real Time erano disegnati con l’ausilio del software PCR “PRIMER EXPRESS”.

Le sequenze oligonucleotidiche dei diversi primers sono riportate in tabella 2.1 con le rispettive temperature di melting (T_M).

Primer	Sequenze 5’→3’	T _M
Primers degenerati:		
<i>Forward</i>		
Cyt for1	5’-AAGCCSGAACACATHAGRGACGAR-3’	65 °C
Cyt for2	5’-AARGATGTRCCAGGYCCAGACATH-3’	64 °C
Cyt for3	5’-CTTTGCCTTGTCGCCATGGAG-3’	66 °C
<i>Reverse</i>		
Cyt rev	5’-TACDATGTGYTCCTGRTCTCCWCG-3’	66 °C
Cyt rev3	5’-CAGTTAGCTTCATGTACATGG-3’	60 °C
Primers sequenza specifica:		
<i>Forward</i>		
Cyt F2	5’-ATCGCCACTGGTGTACTGTTGA-3’	66 °C
<i>Reverse</i>		
Cyt Rev1	5’-AGCTAGGAAGAGTGAAGGTATCA-3’	64 °C
Primers Real-time PCR		
<i>Forward</i>		
Cyt RT For	5’-ATACGAGCGCCTCATTTTGG-3’	60 °C
<i>Reverse</i>		
Cyt RT Rev	5’-TTGCCAGCGTCGATGTTGT-3’	58 °C
Primers sub-clonaggio:		
<i>Forward</i>		
Cyt-NCO	5’-CCCCCCCCATGGCGGGAAGTGAATCCT-3’	82 °C
<i>Reverse</i>		
Cyt-BamH1	5’-CCCCGGATCCCCTATGCAAGGTGGGTGGTAT-3’	83 °C

Tabella 2.1: Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati e relative temperature di melting.

2.2.2 PCR e Sequenziamento

Le reazioni di PCR venivano eseguite in un termocicizzatore Gene Amp PCR SYSTEM 2700 e 2720.

La reazione di PCR per l'amplificazione del cDNA era condotta nelle seguenti condizioni:

Buffer 1X; MgCl₂ 2,5 mM; dNTPs 200 µM; primers 0,5 µM; cDna 10 ng; Taq polimerasi 1 U.E (Fermentas).

I tempi e le temperature di amplificazione venivano variate in funzione della lunghezza del frammento: 30 secondi per frammenti con una lunghezza minore o uguale a 1000 bp; 60 secondi per frammenti compresi tra 1000 e 2000 bp, e delle temperature di melting dei primers riportati in tabella 1.

La dimensione dei frammenti amplificati mediante PCR veniva verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5%, utilizzando come marcatore di peso molecolare un *ladder 100-200* (Fermentas).

I frammenti di lunghezza attesa erano purificati con l'ausilio del Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciencies), che utilizza un agente caotropico per dissolvere l'agarosio e promuove il legame del DNA a doppia elica ad una colonnina costituita da una matrice di fibra di vetro, la procedura era effettuata secondo le istruzioni fornite dal produttore,

I frammenti amplificati per PCR venivano sequenziati secondo il metodo enzimatico di Sanger (1977), usando l'ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, che utilizza l'AmpliTaq DNA polimerasi.

La miscela per la reazione di sequenza conteneva (volume finale di 5µl): DNA (60-300 ng) BIG DYE 1X; primers (forward o reverse) 0.8 pM; H₂O bidistillata.

La reazione di sequenza avveniva nelle seguenti condizioni: 96°C per 10 secondi; 50°C per 5 secondi; 60°C per 4 minuti (25 cicli); lo strumento era Gene Amp PCR SYSTEM 2700 e 2720 (Applied Biosystems).

In questa reazione oltre ai comuni dNTP (deossinucleotidi) sono presenti i 4 dideoossinucleotidi (ddNTP) marcati con diversi fluorofori; questi ddNTP hanno un 3'-H invece di 3'-OH nello zucchero deossiribosio e per cui quando vengono inseriti nella catena di DNA in fase di allungamento, impediscono la formazione del legame fosfodiesterico bloccando la reazione di sintesi. Si ottengono così vari prodotti di PCR di diversa lunghezza, ognuno terminante con un nucleotide marcato con uno specifico colore.

Le componenti della reazione in eccesso venivano allontanati mediante precipitazione con etanolo e sale. I campioni erano risospesi in 15 µl di formammide e denaturati a 94 °C per 3 minuti.

I frammenti venivano caricati in un sequenziatore automatico capillare 310 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems), che sottopone frammenti di DNA ad elettroforesi capillare su gel fluido di poliacrilammide e durante la corsa un laser eccita i gruppi fluorescenti permettendo di determinare quale particolare nucleotide è presente in ogni posizione. Le

informazioni vengono quindi inviate ad un computer che le rielabora in un elettroferogramma e quindi in sequenza nucleotidica, il cromatogramma ottenuto è analizzato mediante il software BioEdit Sequence Alignment Editor.

2.3 Clonaggio della sequenza codificante G6PDH citosolica

La sequenza codificante la G6PDH citosolica di orzo veniva clonata nel il vettore pGEM-T (Promega).

L'inserto veniva ligato nel vettore utilizzando la DNA-ligasi del fago T4.

La reazione di ligasi era effettuata come segue: vettore 25 ng; inserto 20 ng; buffer 1x; T4 DNA ligasi 1 unità.

Tale reazione era incubata a 4°C per una notte e poi utilizzata per trasformare cellule competenti *E.coli* del ceppo DH5α.

Un'aliquota di cellule competenti (80μl) veniva aggiunta al prodotto della reazione di ligasi e incubata su ghiaccio per 30 minuti. Successivamente veniva sottoposta a uno shock termico (5 minuti a 37°C, 2 minuti in ghiaccio) allo scopo di favorire l'assunzione del DNA esogeno da parte delle cellule competenti.

La sospensione cellulare veniva piastrata su terreno di coltura LB agarizzato (10% triptone, 4 % yeast extract, 10% NaCl; 1.5% agar), contenente ampicillina (80μg/ml), e incubate a 37°C per circa 16 ore.

Lo screening delle colonie ottenute dalla trasformazione veniva effettuato tramite amplificazione in PCR utilizzando la coppia di

primers universali *pGem for* e *pGem rev* omologa al vettore di clonaggio.

Una tra le colonie cyt-G6PDH-pGEM-T/ DH5α positive era fatta crescere in 3 ml di terreno LB liquido con aggiunta di ampicillina (60μg/ml) per 16 ore. La crescita batterica era centrifugata e il pellet utilizzato per l'estrazione e la purificazione del plasmide cyt-G6PDH-pGEM-T mediante il Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), seguendo il protocollo fornito dal produttore.

La sequenza codificante cyt-G6PDH, contenuta nel plasmide pGEM-T purificato, era amplificata con primers (cyt-BAMH1, cyt-NCOI) contenenti i siti di taglio per gli enzimi di restrizione *Bam*HI e *Nco*I, il frammento amplificato veniva purificato Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciencies) come descritto in precedenza e utilizzato per il sub-clonaggio nel vettore di espressione pET3d.

La sequenza cyt-G6PDH così amplificata e il vettore pET3d venivano separatamente digeriti con gli enzimi di restrizione *Bam*H1 e *Nco*I (Takara) per 1 h a 37 °C, secondo protocollo del produttore.

La riuscita della digestione enzimatica operata sul plasmide pET3d e sulla sequenza cyt-G6PDH veniva analizzata su gel e i frammenti ottenuti purificati con l'ausilio del Kit (Amersham Biosciencies) come precedentemente descritto.

Il plasmide e la sequenza digeriti e purificati erano usati per allestire una reazione di ligasi con l'enzima T4-ligasi (Roche)

secondo protocollo del produttore, per permettere la formazione del plasmide ricombinante cyt-G6PDH-pET3d.

Il plasmide ricombinante ottenuto veniva utilizzato per trasformare le cellule termo-competenti *E.coli* del ceppo BL21 (DE3), mediante shock termico come precedentemente descritto.

2.3.1 Crescita dei batteri ricombinanti

I batteri (*E.coli* BL21(DE3) ricombinanti contenenti il plasmide con la sequenza citosolica della G6PDH (cyt-G6PDH-pET3d) venivano fatti crescere in beute da 2000 ml in terreno LB contenente ampicillina come marcatore selezionabile (60 µg/ml) in una camera termo controllata a 37°C in agitazione ad una velocità di 170 RPM (rotazioni per minuto).

2.3.2 Test di espressione

Un test di espressione veniva allestito al fine di verificare la produzione della proteina ricominante: 4 colonie venivano isolate tra quelle cresciute in piastra, ognuna era inoculata in una provetta contenente 3 ml di LB + AMP e fatta crescere a 37°C e 170 RPM. Dopo circa 4 ore dall'inoculo veniva aggiunto isopropil β-D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) 0,1 mM per indurre l'overespressione della proteina, e incubate di nuovo per la crescita standard come già descritto. Dopo 90 minuti dall'aggiunta di IPTG un'aliquota di 200 µl era prelevata da ogni provetta, centrifugata per 10 min a 13000 RPM, i pellet risospesi

in 30 µl di TE (30 mM Tris HCl pH 8.2 + 1mM EDTA) + 8 µl di BBF (Blu di bromofenolo) 5X. I campioni erano poi sottoposti a SDS-PAGE e i gel colorati con blu Coomassie per verificare la produzione della proteina ricombinante rispetto al controllo negativo (batteri trasformati con il plasmide pET-3d nativo). La colonia che mostrava la maggiore produzione di proteina ricombinante veniva quindi utilizzata per la crescita massiva per la purificazione dell'enzima.

2.3.3 Produzione e purificazione della cyt-G6PDH ricombinante

La colonia cyt-G6PDH-pET3d/BL21(DE3) selezionata veniva fatta crescere in 15 ml di LB con ampicillina in una camera termo controllata a 37°C in agitazione ad una velocità di 170 RPM per 16 ore. Una parte della crescita batterica (10 ml) veniva trasferita in 2 litri di LB con ampicillina e la beuta incubata a 37°C – 170 RPM come precedentemente descritto.

Quando la densità della sospensione batterica a 600 nm (OD_{600nm}) raggiungeva il valore di 0,8 U.A. (circa 4 ore), la produzione della proteina era indotta dall'aggiunta di IPTG 0.1mM, e la coltura incubata per la crescita in condizioni standard per altri 90 minuti. Infine, la sospensione batterica veniva raffreddata su ghiaccio, centrifugata per 20 min a 6000 RPM a 4°C (centrifuga Beckman JA25; rotore JA-14), il surnatante allontanato e il pellet risospeso in 15 ml di tampone TE + $MgCl_2$ pH 8.2. La densa sospensione batterica così ottenuta veniva sonicata (sonicatore Misonix) per 10 minuti (impulsi: 30 secondi

On\30 secondi Off, frequenza 4). Il lisato batterico veniva poi centrifugato per 45 minuti a 13000 rpm (centrifuga Beckman JA25), e sul surnatante veniva quindi misurata l'attività G6PDH e la concentrazione di proteine solubili.

Il surnatante del lisato batterico veniva desalato su una colonna GE-Healthcare P10 (Sephadex G25). Venivano caricati 2,5 ml di campione e questi eluiti con l'aggiunta di 3,5ml di TE (30mM HCl, pH 8,2; 1mM EDTA) + 5 mM MgCl_2 .

La proteina eluita e desalata veniva caricata su una colonna per cromatografia a scambio anionico Resource Q-Sepharose (GE-Healthcare - Amersham Biosciences) collegata ad un sistema automatizzato per la purificazione delle proteine Akta Prime plus (GE Healthcare - Amersham Biosciences). La colonna era precedentemente equilibrata con tampone TE+ MgCl_2 pH 8,2. L'assorbimento agli UV, la forza ionica e la pressione esercitata sulla colonna venivano monitorati attraverso un personal computer, collegato al sistema Akta e dotato del software dedicato Primeview (GE Healthcare - Amersham Biosciences).

Le proteine legate alla resina erano eluite applicando un gradiente lineare da 0 a 400 mM di NaCl ad un flusso di 1 ml al minuto. Campioni da 2 ml venivano raccolti e saggiati per l'attività G6PDH, le frazioni attive venivano riunite e desalate come descritto in precedenza.

Le frazioni riunite venivano ulteriormente purificate per cromatografia di affinità: il campione veniva caricato su una colonna His-Trap Blue HP, precedentemente equilibrata con tampone TE+ MgCl_2 pH 8,2 e collegata con il sistema Akta Prime.

Venivano quindi applicati 5 ml di un tampone TE + NAD⁺ 10 mM per allontanare gli enzimi che interagiscono con il NAD⁺; dopo un lavaggio con 10 ml di tampone TE, venivano applicati 5 ml di un tampone TE + NADP⁺ 2 mM per allontanare gli enzimi che interagiscono con il NADP⁺ più debolmente legati alla colonna; la proteina ricombinante, fortemente legata alla resina blue-sepharose, veniva eluita con un tampone TE + NADP⁺ 5 mM + NaCl 1,5 M. Venivano raccolte frazioni da 1 ml, saggiate per la attività G6PDH; le frazioni attive eluivano in un unico picco e venivano riunite e la presenza della proteina ricombinante verificata mediante SDS-page e Western blotting. Su questo campione venivano determinate le costanti cinetiche.

2.4 Saggi enzimatici

2.4.1 Preparazione dell'estratto grezzo

Per l'estrazione proteica da piante d'orzo, radici e foglie venivano prelevate, separate e pesate. I campioni venivano polverizzati a mano in un mortaio con aggiunta di azoto liquido, successivamente era aggiunto il tampone di estrazione in rapporto peso/volume 1:2, composto da 50 mM Tris-HCl a pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 4 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA), 10% glicerolo, 15 µM NADP⁺, 1 ml/30 gr Protease Inhibitor Cocktail (Sigma P9599). I campioni erano omogeneizzati fino all'ottenimento di una poltiglia omogenea, che veniva poi filtrata attraverso 4 strati di garza. L'estratto così ottenuto era centrifugato per 20' a 20000 g a 4°C (centrifuga Beckman J2-21

rotore Beckman JA-25). Il surnatante era definito estratto grezzo e utilizzato per i saggi enzimatici.

2.4.2 Determinazione delle proteine

La concentrazione proteica dei campioni veniva misurata secondo il metodo di Bradford (1976) con albumina di siero bovino come standard (Biorad Protein Assay).

Durante gli step cromatografici le proteine erano monitorate a 280 nm.

2.4.3 Determinazione della attività G6PDH

L'attività G6PDH veniva valutata misurando la riduzione del NADP^+ a 340 nm; la miscela di reazione aveva la seguente composizione: Tris HCl 25 mM pH 8; MgCl_2 5 mM; NADP^+ 150 μM ; G6P 3 mM; estratto (10-100 μl ; 3-60 μg); bianco senza G6P.

Tutte le misurazioni erano effettuate in cuvette da 1 cm di cammino ottico, e la variazione di assorbanza veniva misurata utilizzando uno spettrofotometro Beckman DU-65 equipaggiato con modulo cinetico (Kinetics Pack Module).

Tutte le misure erano effettuate in duplicato o triplicato. L'attività era espressa come nm di NADP^+ ridotto $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$

2.4.4 Trattamento campioni con DTT

Negli esperimenti per la misura dell'effetto dello sugar sensing, l'attività della isoforma citosolica della G6PDH era misurata negli estratti grezzi trattati con 60 mM DTT per 45 minuti.

Esperimenti di controllo effettuati su vari campioni hanno dimostrato che questo trattamento con DTT provoca la totale inibizione delle isoforme plastidiali, sensibili ai riducenti, permettendo così di misurare la attività della sola cyt-G6PDH.

2.4.5 Determinazione delle caratteristiche cinetiche

Le costanti cinetiche venivano calcolate allestendo saggi di attività G6PDH a concentrazioni variabili dei substrati.

Per la determinazione delle K_m i saggi di attività veniva allestiti a concentrazioni variabili di $NADP^+$ da 0 a 150 μM e di G6P da 0 a 30 mM.

La determinazione delle K_{iNADPH} veniva effettuata a 3 concentrazioni subsaturanti di $NADP^+$ (50 μM , 30 μM ; 15 μM), e variando la concentrazione di inibitore NADPH da 0 a 150 μM . I parametri cinetici erano calcolati con l'ausilio del software Graph Pad Prism 4.0.

2.3.3 Elettroforesi SDS-PAGE e Western blotting

I campioni ottenuti durante le fasi di purificazione della proteina ricombinante cyt-G6PDH venivano caricati su un gel SDS-page (running gel al 10% e staking gel al 4% di poliacrilammide) e sottoposte a corsa elettroforetica (180 V e 40 mA).

I campioni erano preventivamente denaturati per 10 min a 100°C in 0.125 M Tris- HCl; 4% SDS; glicerolo 20%; 0.2 M DTT; 0.02% blu di bromofenolo pH 6.8.

Le proteine separate sul gel erano visualizzate mediante blue di Coomassie.

Per la colorazione con blue Coomassie veniva utilizzata una soluzione composta da: 0.25 % Coomassie R250 in 50 % etanolo, 10 % acido acetico. Dopo circa 20 minuti in agitazione il gel veniva decolorato in 7,5% acido acetico, 5% etanolo.

I polipeptidi separati attraverso l'elettroforesi SDS-PAGE venivano sottoposti ad una analisi Western Blotting. Le proteine presenti sul gel venivano trasferite su membrana di nitrocellulosa Hybond (Scheichler - Schuell Protran BA 83 0.2 μ M) applicando una corrente di 25 V/300 mA per 2 h. Il trasferimento era effettuato in "Transfer Buffer" (Tris 0.8 M, 0.4 M glicina, 5.6 M SDS, 10% di metanolo).

Il corretto trasferimento delle proteine veniva verificato colorando la membrana di nitrocellulosa con rosso Ponceau per 20'. Il colorante veniva allontanato con tre lavaggi da 10 min in TBS (tampone Tris salino: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM NaCl) e poi la membrana veniva incubata per 2 h con anticorpo primario per cyt-G6PDH (Wendt et al., 2000). I peptidi di interesse venivano identificati mediante incubazione con anticorpo secondario (anti-rabbit IgG - sviluppato in capra - coniugato con fosfatasi alcalina - Sigma A3687). La localizzazione del complesso antigene-anticorpo veniva evidenziata mediante l'aggiunta del substrato BCIP/NBT (Sigma). Dopo 5-10 minuti la soluzione di sviluppo veniva allontanata e la reazione era bloccata con una soluzione 1% acido acetico.

2.6 Esperimenti con *Blumeria graminis*

2.6.1 Selezione delle cultivar di orzo e dei ceppi patogeni

Le piante da utilizzare per gli esperimenti di infezione sono stati scelti in base alle caratteristiche di resistenza e di suscettibilità contro i ceppi di *Blumeria graminis* K1 e A6 (tabella 6.1 in appendice) riportate in precedenza (Seeholzer et al., 2010).

Questi due ceppi di *Blumeria graminis* (K1, A6) si differenziano per il set di geni AVR che codificano e che sono riconosciuti in maniera specifica dai geni MLA di orzo; K1: AvrMla1, AvrMla3, AvrMla7, AvrMla13, and AvrMla22; A6: AvrMla3, AvrMla6, AvrMla7, AvrMla9, AvrMla10, AvrMla12, and AvrMla13 (Bieri et al., 2004).

La suscettibilità delle piante all'attacco fungino veniva classificate in cinque livelli in base agli effetti macroscopici osservati: (i) completa immunità senza visibile crescita fungina; (ii) crescita fungina appena rilevabile; (iii) occasionale crescita fungina; (iv) ampia crescita di funghi; (v) abbondante crescita fungina.

Basandosi sui dati presenti nella tabella 6.1 riportata in appendice e su dati noti in bibliografia, venivano effettuati alcuni esperimenti preliminari per verificare gli effetti dell'infezione da *Blumeria graminis* K1 su alcune linee di piante. Al termine di questa fase preliminare venivano scelte per gli esperimenti le piante della linea *Manchuria* MLA1 con livello di suscettibilità "i"

e le piante della linea *Manchuria* MLA6 con livello di suscettibilità “v”.

2.6.2 Crescita delle piante di orzo

I semi di orzo erano messi a germinare in capsule petri su carta inumidita con acqua deionizzata, dopo 1 giorno a 4°C e 2 giorni a temperatura ambiente erano trasferiti in terreno (Einheitserde Classic) ed incubati per la crescita in camere termoregolate a 20 °C e sottoposte ad un fotoperiodo di 16 h di luce/8 h di buio con un umidità relativa del 50%.

Dopo cinque giorni di crescita le piante campione venivano infettate con spore di *Blumeria graminis* dell’isolato K1 e incubate in camere termoregolate isolate dalle piante controllo non infettate.

2.6.3 Infezione delle piante con *Blumeria graminis*

L’infezione veniva propagata a partire da altre piante d’orzo (cv Golden promise) infette mediante scuotimento su piante sane in modo da provocare la caduta delle spore del fungo sulle foglie delle piante ospite.

Le piante così infettate venivano trasferite in incubatori isolati con una temperatura di 20 °C e un ciclo luce buio di 16/8 ore.

Le piante venivano controllate ogni giorno al fine di valutare gli effetti macroscopici dell’infezione e il grado di propagazione del patogeno.

Le piante controllo, non sottoposte ad infezione, venivano cresciute nelle stesse condizioni in incubatori isolati.

2.6.4 Estrazione dell'RNA e Real Time PCR

I prelievi di foglie dalle piante infette e dalle piante controllo erano effettuati a tempi prestabiliti: prima dell'infezione e dopo 9, 12 24 e 48 ore dall'infezione.

L'RNA dai campioni di foglie veniva estratto con il Kit SV Total RNA Isolation System (Promega) secondo protocollo fornito dalla casa.

L'integrità e la concentrazione dell'RNA erano stimate mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% e lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nM (Nanodrop 1000 spectrophotometer, Thermo Scientific) per quantificare la concentrazione di RNA e stimare eventuali contaminazioni da fenoli e proteine.

I campioni di RNA venivano tutti diluiti ad una concentrazione finale di 100 ng/μl.

Il cDNA era sintetizzato a partire dai campioni di RNA utilizzando il sistema di RT-PCR ThermoScript™ (Invitrogen).

La reazione di retrotrascrizione era allestita secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice utilizzando 4 μg di RNA. I campioni venivano trasferiti in un termociclatore preriscaldato e sottoposti ad un ciclo di sintesi: 50°C per 60 minuti; 85°C per 5 min.

I campioni di cDNA ottenuti a vari tempi dopo l'infezione erano usati per un'analisi Real-time PCR o qPCR, per valutare l'eventuale variazione dei livelli di espressione della cyt-G6PDH nelle ore successive all'infezione patogena.

La qPCR, ossia reazione quantitativa di PCR è una tra le più potenti e sensibili tecniche di analisi molecolare.

Il principio di base della Real-Time PCR, che permette quindi la quantificazione di uno specifico trascritto, è l'utilizzo della misura di un segnale fluorescente, dovuto all'uso di molecole fluorocromate nella miscela di reazione, proporzionale all'ammontare di prodotto amplificato.

Appositi software acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e convertono la variazione di fluorescenza in una rappresentazione in tempo reale della cinetica d'amplificazione.

La Real-time PCR utilizza i parametri della fase esponenziale di amplificazione in modo da fornire dati più precisi ed accurati per la quantificazione. Lo strumento calcola due valori critici della fase esponenziale: la linea soglia, che rappresenta il livello di rilevamento in cui una reazione raggiunge una intensità di fluorescenza sopra al di sopra del rumore di fondo, e il ciclo soglia (Ct), che è il ciclo in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza e dove cioè i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema. Il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie target presente inizialmente. Il valore di Ct è utilizzato per la quantificazione.

La reazione di real time PCR veniva allestita utilizzando come fluoroforo il SYBR green (Fast SYBER Green Master Mix, Applied Biosystems) che è una molecola capace di legarsi al DNA a doppio filamento emettendo fluorescenza. Durante la polimerizzazione del DNA questa molecola si intercala aspecificamente nella doppia elica per cui ad ogni ciclo di reazione vi è un aumento di fluorescenza per rilevare l'accumulo dei prodotti di PCR. Per valutare la specificità del segnale prodotto veniva analizzata la curva di dissociazione (usata per individuare eventuali amplificazioni aspecifiche sulla base della temperatura di melting) sui prodotti della PCR ottenuti in ciascuna corsa.

L'analisi del profilo di espressione di *cyt-G6PDH* veniva effettuata confrontando il *Ct* dei campioni di interesse con il *Ct* dei campioni controllo (campioni ottenuti da piante non infette). I dati venivano normalizzati con due geni housekeeping: *CDCP* (proteina di controllo per la divisione cellulare; Ta54227); *RLI* (proteina simile ad un inibitore RNasi, Ta2776).

La stabilità di questi geni era stata mostrata in diverse condizioni e per diversi organismi cellulari (Paolacci et al., 2009; Giménez et al., 2011).

L'analisi di espressione svolta è una quantificazione relativa, il punto preso come riferimento è dato dai livelli di trascritto letti nel campione prima dell'infezione a cui è dato il valore 1.

Il protocollo di amplificazione della realtime PCR era il seguente: 5µl di cDNA, 600 nM Primer Forward, (CYT RT FOR) 250 nM

Primer Reverse (CYT RT REV), 8 µl 2 x SYBR GREEN PCR Master Mix, volume finale di reazione 16 µl.

La Real Time PCR era realizzata utilizzando uno strumento Applied Biosystems 7500 e i dati analizzati dal software fornito dall'apparecchio stesso.

2.7 Analisi Bioinformatica

Le sequenze sia nucleotidiche che amminoacidiche ottenute sono state confrontate con quelle presenti in banca data mediante l'utilizzo di diversi programmi bioinformatici sia residenti che presenti in rete.

Il programma BioEdit versione 7.0.1 (Hall 1999)

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

è stato utilizzato per allineare le sequenze e costruire dendrogrammi.

Le sequenze sono state utilizzate come queries per interrogazioni in GeneBank attraverso l'algoritmo di ricerca NCBI BLAST (Altschul et al. 1997):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ricerca regioni di similarità tra sequenze. Il programma compara sequenze nucleotidiche al database di sequenze e calcola la significatività statistica degli appaiamenti.

Il programma utilizzato per la traduzione amminoacidica della sequenza nucleotidica è stato Expasy Translate tool:

<http://web.expasy.org/translate/>

Gli allineamenti globali tra due o più sequenze nucleotidiche sono stati effettuati con il programma bioinformatico CLUSTAL W: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Le sequenze amminoacidi utilizzate per l'analisi filogenetica sono reperibili nei seguenti siti web:

per *Medicago truncatula*

(<http://blast.jcvi.org/er-blast/index.cgi?project=mtbe>)

per *Populus trichocarpa*

(<http://genome.jgipsf.org/Poptr11/Poptr11.home.html>),

per *Phiscomitrella patens*

(<http://genome.jgipsf.org/Phypa11/Phypa11.home.html>),

per *Anabaena*

(<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Anabaena>),

per *Arabidopsis thaliana*

(<http://blast.jcvi.org/er-blast/index.cgi?project=ath1>),

per *Chlorella*

(http://genome.jgi-psf.org/ChINC64A_1/ChINC64A.home.html),

per *Batrachomyces dendrobatidis*

(<http://genome.jgipsf.org/Batde5/Batde5.home.html>).

Sul sito web di NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

sono state reperite le sequenze amminoacidiche di: *Dunaliella bioculata*, *Drosophila melanogaster*, *Erwinia caryophylli*, *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, *Spinacea oleracea*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Galdieria sulphuraria*, *Nicotiana glauca*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Phaeodactylum tricornutum*.

La costruzione dell'albero filogenetico è stata eseguita utilizzando il sito web: <http://align.genome.jp/>.

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 Isolamento della sequenza codificante cyt-G6PDH

La sequenza citosolica G6PDH è stata isolata da cDNA ottenuto dall'estrazione di RNA totale da radici di orzo (cv Nure).

L'elettroforesi di controllo dei prodotti di PCR (figura 6.1 in appendice) effettuata con sei diverse combinazioni possibili di primers (tabella 6.2 in appendice) mostra che solo in un caso si ottiene la produzione di un frammento dal peso atteso di circa 330 bp. La banda amplificata veniva purificata, sequenziata e confrontata con le sequenze genomiche depositate nei database biologici con l'ausilio del pacchetto bionformatico "BLAST".

Il confronto mostrava un'identità di sequenza del 100% con una sequenza "EST" dalla lunghezza di 1883bp (AK249122) ottenuta da un clone di una library di cDNA di *Hordeum vulgare* (c.v *Haruna nijo*) (Sato et al, 2007).

Sulla base della EST venivano disegnati dei primers specifici cyt-G6PDH con cui si amplificava il cDNA di orzo. La reazione di PCR produceva un frammento di 1767 coppie di basi (figura 3.1); la regione codificante era di 1530 nucleotidi, corrispondente ad una proteina di 509 residui amminoacidici.

	10	20	30	40	50	
cyt	gagtcaggaaggaaggaaggcgccacccccctccccctccccactcca				
	60	70	80	90	100	
cyt	tccacccagcatcccagcagtaactctccccctccgcccctcccacgcg				
	110	120	130	140	150	
cyt	gcgcgcgcgcgaatctcgatcgccactgggtgtactggttgaagggagaaga				
	160	170	180	190	200	
cyt	gaatcatcctattcgtcatggcggggaactgactcctcggcgtcatcgaga				
	210	220	230	240	250	
cyt	caaagcagttttaactcattagcaaaggatctagaacttcctttggagca				
	260	270	280	290	300	
cyt	agggtgcctgactatcgttgtacttggggcttctggagaccttgccaaga				
	310	320	330	340	350	
cyt	agaaaacgttcccggcactctaccacctttttgaacaggggttcttacia				
	360	370	380	390	400	
cyt	tctggtgaagtgcataatagttgggtatgcgagaacaaatctttctgatga				
	410	420	430	440	450	
cyt	tgggttgagagggcgcatccgtgcataccttaaaggagcctcagaggagc				
	460	470	480	490	500	
cyt	atgtttcagaattcttgcaattgataaaatatgtcgggtggctcctatgac				
	510	520	530	540	550	
cyt	agtggagaagggttttgaaaaactgaacaaggaaatatcagattatgagat				
	560	570	580	590	600	
cyt	gtcaaacaactcaggaagctcccgtaggctcttttacttggcattgcctc				
	610	620	630	640	650	
cyt	catctgtctacccttcagtgtgcaaaatgatccgaacatatattgcatgagt				
	660	670	680	690	700	
cyt	ccaacttctcgcaactggatggactagagtaattggttgagaagccctttgg				
	710	720	730	740	750	
cyt	aagggacctggactcagcagaagaattaagttcccaacttgggggagctat				
	760	770	780	790	800	

```

cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      tccaggaagatcaactctacaggattgaccactacttgggaaaagagttg

      810      820      830      840      850
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      gtccaaaacttgcttgtgcttcgttttgcgaaccgtttgttcttaccact

      860      870      880      890      900
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      ttggaaccgtgacaatgttgataatacacagattgtattcagggaggact

      910      920      930      940      950
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      tcggaactgatgggctggaggatattttgatcaatatggaatcatccgt

      960      970      980      990     1000
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      gatatcattcagaaccatttggtgcaggttttctgtttggttgcaatgga

      1010     1020     1030     1040     1050
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      aaagcctgtatctcttaagcctgagcacattagagatgagaaagtcaagg

      1060     1070     1080     1090     1100
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      ttctgcaatctgtgaacccgataaaggacgaagaggtagtccttggacaa

      1110     1120     1130     1140     1150
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      tatcagggctacaaggatgaccctacagtgccagatgactctaatacccc

      1160     1170     1180     1190     1200
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      aacgtttgcatctattgtacttagggtacacaatgaaagatgggaagggtg

      1210     1220     1230     1240     1250
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      tccctttcattcttaaagctggtaaagcattaaactcaagaaaagcagaa

      1260     1270     1280     1290     1300
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      attcgtgtgcagttcaaggatgttcccggtgacatttttaaagtgaagaa

      1310     1320     1330     1340     1350
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      gcaaggaagaaatgagtttgtcatacgcctccagccatcagaagccatgt

      1360     1370     1380     1390     1400
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      atatgaaactaactgtgaagaaacctggattggaaatggctactgaacag

      1410     1420     1430     1440     1450
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      agtgaacttgatctgtcatatgggatgcggtaccaagatgtcaaaattcc

      1460     1470     1480     1490     1500
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      agaggcatacgagcgcctcattttggatacaataagaggagaccagcaac

      1510     1520     1530     1540     1550
cyt      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      actttgtgcgccgggatgagctgaaggctgcctggcagatcttcactccc
```



```

      1560      1570      1580      1590      1600
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cyt  ttgttgcaacaacatcgacgctggcaagctgaaggctgtttcatacaagcc

      1610      1620      1630      1640      1650
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cyt  tggcagccgtggccccaaggaagctgatgaactgagtgagaagggtgggt

      1660      1670      1680      1690      1700
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cyt  acatgcagaccacggttacatctggataccaccacccttgcatagagt

      1710      1720      1730      1740      1750
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cyt  gcctctctcgatccttctaggttgtttagctaggaagagtgaaggtatca

      1760
      .....|.....|.....|..
cyt  cggataaaaatcttacg
```

Figura 3.1: Sequenza cyt-G6PDH isolata da radici di orzo.
La regione codificante inizia al nucleotide in posizione 168 e termina al nucleotide in posizione 1697.

3.1.1 Allineamento delle sequenze ed analisi filogenetica

La sequenza ottenuta da cDNA di radici di orzo codifica per una G6PDH come confermato dal confronto con le sequenze disponibili in database genomici.

L'identità e la conservazione della sequenza nucleotidica per la G6PDH di *H. vulgare* sono state confrontate con altre sequenze G6PDH note utilizzando il programma bioinformatico "BLAST".

In particolare l'analisi dei valori di identità (tabella 3.1) tra la cyt-G6PDH di orzo e le altre cyt-G6PDH note in organismi vegetali sono sempre superiori al 66%. Al contrario, quando il confronto viene fatto con sequenze di isoforme compartimentate, il valore percentuale è sempre inferiore al 50%.

L'identità maggiore è stata rilevata con le G6PDH di frumento (*T. aestivum*) e riso (*O. sativa*), piante monocotiledoni come l'orzo.

Organismi vegetali	Localizzazione	Identità
<i>Triticum aestivum</i>	citosolica	94%
<i>Oryza sativa</i>	citosolica	88%
<i>Solanum tuberosum</i>	citosolica	76%
<i>Nicotiana tabacum</i>	citosolica	74%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	citosolica	70%
<i>Solanum tuberosum</i>	cloroplastica	50%
<i>Nicotiana tabacum</i>	cloroplastica	50%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	cloroplastica	49%
<i>Solanum tuberosum</i>	plastidiale	49%
<i>Nicotiana tabacum</i>	plastidiale	49%
<i>Hordeum vulgare</i>	plastidiale	48%
<i>Dunaliella bioculata</i>	plastidiale	48%

Tabella 3.1: Analisi bioinformatica. Confronto tra la sequenza nucleotidica della G6PDH di *H. vulgare* con le sequenze G6PDH di altri organismi vegetali

Per l'analisi dell'albero filogenetico (figura 3.2) sono state confrontate 37 sequenze amminoacidiche G6PDH (figura 6.2 in appendice) disponibili nei database provenienti da differenti organismi: piante superiori (*Medicago truncatula*, *Populus trichocarpa*, *Sorghum bicolor*, *Spinacea oleracea*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*), Briofite (*Physcomitrella patens*), alghe verdi (*Dunaliella bioculata*, *Chlorella vulgaris*), alghe rosse (*Galdieria sulphuraria*), funghi (*Batrachochytrium dendrobatidis*, *Saccharomyces cerevisiae*), batteri (*Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi*), cianobatteri (*Anabaena cylindrica*), diatomee (*Phaeodactylum tricornutum*), Metazoi (*Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*). Le sequenze G6PDH tendono a formare tre differenti cluster in funzione della compartimentazione subcellulare. Infatti si osserva che tutte le sequenze di isoforme compartimentate si separano nettamente da quelle delle isoforme G6PDH citosoliche; inoltre, tra le varie sequenze compartimentate si assiste ad un'ulteriore separazione tra le sequenze dell'isoforma cloroplastica e quelle dell'isoforma plastidiale.

La sequenza di G6PDH di orzo qui sequenziata si colloca nel cluster formato dalle G6PDH citosoliche ed in particolare nel ramo dove è posizionata la sequenza G6PDH di frumento.

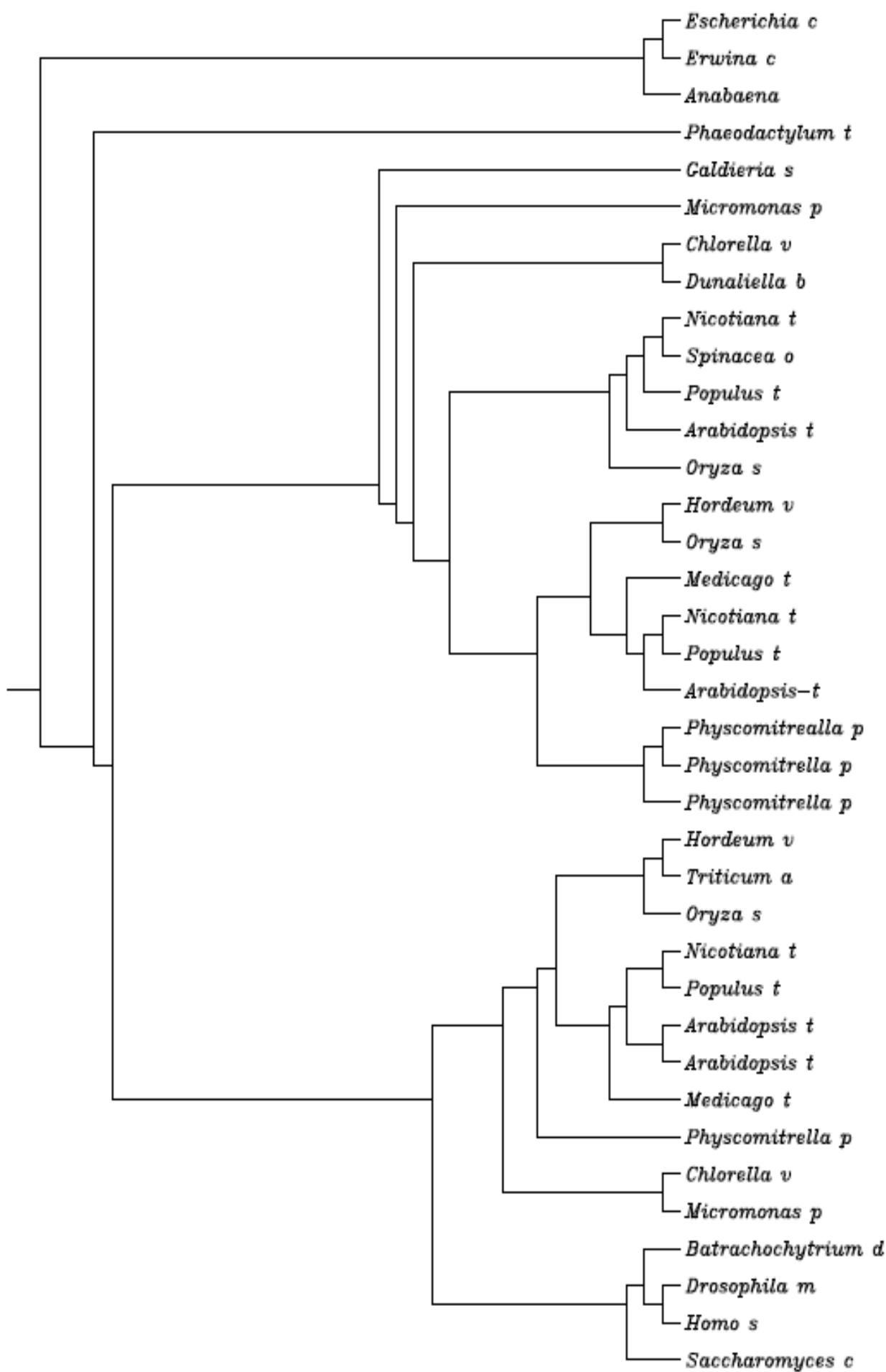


Figura 3.2 : Albero filogenetico G6PDH. Per le sigle identificative degli organismi vedi appendice.

La sequenza amminoacidica di orzo è stata allineata con alcune sequenze G6PDH vegetali presenti in banca dati.

L'allineamento evidenzia la presenza di motivi caratteristici come il Rossman-fold (tipico delle deidrogenasi), il sito attivo dell'enzima, il sito di legame del NADP^+ (NELVI) (figura 3.3) .

Le sequenze citosoliche non presentano il peptide di transito caratteristico e necessario delle isoforme compartimentate, ed inoltre nelle sequenze citosoliche non sono conservate all'N-terminale (posizione 177 e 184) le due cisteine responsabili della regolazione redox tipica delle isoforme P1 e P2.

Inoltre è interessante notare che il sito attivo delle isoforme citosoliche si differenzia leggermente da quello delle isoforme plastidiali, infatti la sequenza caratteristica del sito attivo delle cyt-G6PDH è YRIDHYLGK, mentre le plastidiali presentano un cambiamento nel primo amminoacido della sequenza del sito attivo FRIDHYLGK (una fenilalanina al posto di una tirosina).

	5152535455
Nt_P1	MGGQLQLNP-----CSSSSVAT---TFHNG-----AHKFCRNFNILPFAKHSLESSVA
At_cyt	MATHSMIIPSPS-----SSSSSLATAASPFKET-----LPLFSR---SLTFPRKSLF----
Nt_cyt	-----
At_cyt	-----
Hv_P2	MALSCMRCPVAAGPAVRRPSSSSVALSLARCGGR--PAAVASGGWRIHAVAGKG-----
Nt_P2	MVTLYSSPSTHSSGPVASYNSSSIGLYNYHHNKQIAVSSILSRKFGSLQINQKPFWN---
Hv_cyt	-----
Clustal Co	-----

	65758595105115
Nt_P1	STFHNGIYSRIQPRKHFEIMSSNGFHLNAVSLLDGSASKSMPEQVPLTELENAETTTSIT
At_cyt	---SQVRLRFFAEKHSQLDTSNGCATNFASLQDS-G-----DQLTEEHVTKGESTLISIT
Nt_cyt	---MAAS---WCIEKRGSIRLDSFRDNDN--IPE-----TGCLSTII
At_cyt	---MGSQG---WHMEKRSTLKNDSFVKEYNP-ITE-----TGSLSTII
Hv_P2	---VVKGPMDTAVENTVAPAAPSPVENGTSSAITV-----EEYEDLASLAKDDEASVSIT
Nt_P2	---AVRMQDGAVATPPSKIENETPLKKLKNIGILPV-APPKEQKDTIDFDSNKAKSTVSIT
Hv_cyt	---MAGT---DSSASSRQSSFNSLAKDLEL-PLE-----QGCLTIV
Clustal Co	-----

	125135145155165175
Nt_P1	VIGASGDLAKKKIFTALFALFYEDCLPEN-FIVFGYSRTKMSDEELRNMTISKTITCRIDQ
At_cyt	VVGASGDLAKKKIFPALFALFYEGCLPQD-FSVFGYARTKLTHEELRDMISSTLITCRIDQ
Nt_cyt	VLGASGDLAKKKKTFPALFNLFYRQGFLOSNEVHIFGYARTKISDDDLRGRIRGYLSQGK--
At_cyt	VLGASGDLAKKKTFPALFNLFHQGFLLNPDEVHIFGYARSKITDEELRDKIRGYLVDEKNA
Hv_P2	VVGASGDLAKKKIFPALFALFYEGCLPKH-FSIFGYARSKMTDAELRHMVSKTLITCRIDK
Nt_P2	VVGASGDLAKKKIFPALFALFYEGCLPEH-FTIFGYARSKMTDAELRNMVSKTLITCRIDK
Hv_cyt	VLGASGDLAKKKTFPALYHLFEQGFLLQSGEVHIVGYARTNLSDDGLRGRIRAYLK GAS--
Clustal Co	* ***** ** *

	185195205215225235
Nt_P1	RENGEAKMDHFLERCFYHSQYHSEDDFAELDYKLKAKEGSR----VSNRLFYLSIPP
At_cyt	REKGGDKMEQFLKRCFYHSQYINSEDFAEELNKKLKEKEAGK----ISNRLYYLSSTPK
Nt_cyt	--ENEEEVSEFLQLIKYSQSYDSGEGFSLDKATAEHEIAKNSTEGSSRRLFYFALPPS
At_cyt	S-KKTEALSKFLKLKLYYSCPYDSEEGFKRLDKATLEHEISKKTAEGSSRRLFYALPPS
Hv_P2	RENGSEKMEEFLKRCFYHSQYDSEEDFRELGKKTLEHQGPR----VSNHLYLSIPP
Nt_P2	RENGSEKMEQFLERCFYHSQYDSLLENFAELDKKLKEHEAGR----FSNRLFYLSIPP
Hv_cyt	----EEHVSEFLQLIKYVGSYDSGEGFEKLNKEISDYEMSNN--GSSRRLFYALPPS
Clustal Co	** * * *

	245255265275285295
Nt_P1	IFVDVVRCASLKASSTS---GWTRVIVEKPFGRDLESSELTRCLKKYLTETQIFRIDHY
At_cyt	LLVDEVRCASLRASSEN---GWTRVIVEKPFGRDSESSGELTRCLKQYLTEETQIFRIDHY
Nt_cyt	VYPSVCRMINKYCMNKSDLGGWTRIVVEKPFGKDLASAEQLSSQIGELFDEPQIYRIDHY
At_cyt	YYPVPSKMIKAWCTNKSDDLGGWTRIVVEKPFGKDLASAEQLSSQIGALFEPPQIYRIDHY
Hv_P2	IFLDVVKCASKSASSAS---GWTRVIVEKPFGRDSESSAALTRGLKEFLAEDQIFRIDHY
Nt_P2	IFINAVRCASLSASSAH---GWTRVIVEKPFGRDSESSAALTRSLKQYLNEDQIFRIDHY
Hv_cyt	VYPSVCKMIRTYCMSPTSRTGWTRVIVEKPFGRDLDSAEELSSQLGELFQEDQLYRIDHY
Clustal Co	: . **** :*****: : * : : * * :*****

	305315325335345355
Nt_P1	LGKELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQFIISEDSGTEGRGGYFDNYGIIRDIMQN
At_cyt	LGKELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQLIISEDFGTEGRGGYFDQYGIIRDIMQN
Nt_cyt	LGKELVQNLLVLRFANRFFLPLWNRDNIQIVFREDFGTEGRGCGYFDEYGIIRDIIQN
At_cyt	LGKELVQNMLVLRFANRFLPLWNRDNIANVQIVFREDFGTEGRGGYFDEYGIIRDIIQN
Hv_P2	LGKELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRQYIRNVQLIISEDFGTEGRGGYFDSYGIIRDIMQN
Nt_P2	LGKELVENLSVLRFSNLI FEPLWSRQCIRNVQFIISEDFGTEGRGGYFDHYGIIRDIMQN
Hv_cyt	LGKELVQNLLVLRFANRFLPLWNRDNDNIQIVFREDFGTDGRGGYFDQYGIIRDIIQN
Clustal Co	*****::: **** * . * ****::: :*::* * * * * * * * * * * * * * * *

	365375385395405415
Nt_P1	HLLQILALFAMETPVSMDAEDIRNEKVKVLRSMRPLQLEDVVVGQYKGHS---KGGKLY
At_cyt	HLLQILALFAMETPVSLDAEDIRSEKVKVLRSMKPLRLEDVVVGQYKGHN---KGGKTY
Nt_cyt	QLLQVLCVLAMEKPVSKPEHIRDEKVKVLSMLPIKDEEVVLGQY-----E-----
At_cyt	HLLQVLCVLAMEKPISLKPEHIRDEKVKVLSVPIKDEEVVLGQY-----E-----
Hv_P2	HLLQILALFAMETPISLEAEDIRNEKVKVLRSMKPLRLEDVVIGQYKSHT---KGGITY
Nt_P2	HLLQILALFAMETPVSLDAEDIRNEKVKVLRSMRPLQLDDVIGQYKCHT---KGDVTY
Hv_cyt	HLLQVFCVLAMEKPVSLKPEHIRDEKVKVLSVNPPIKDEEVVLGQY-----Q-----
Clustal Co	:*::*::* *

	425435445455465475
Nt_P1	PAYTDDPTVPNGSVTPTFSAAAALFINNARWDGVPFLLMKAGKALHTRRAEIRVQFRHVPGN
At_cyt	PGYTDDPTVPNHSLTPTFAAAAMFINNARWDGVPFLLMKAGKALHTRGAEIRVQFRHVPGN
Nt_cyt	-GYKDDPTVPDNSNTPTFATMVLRIHNERWEGVPFLLMKAGKALNSRKAIRVQFKDVPGD
At_cyt	-GYRDDPTVPDNSNTPTFATTILRINNERWEGVPFLLKAGKAMSKKADIRIQFKDVPGD
Hv_P2	PGYTDDKTVPKGSLLTPTFAAAALFINNARWDGVPFLLMKAGKALHTKQAEIRVQFRHVPGN
Nt_P2	PGYTDDKTVPKDSLTPTFAAAALFIDNARWDGVPFLLMKAGKALHTRSAEIRVQFRHVPGN
Hv_cyt	-GYKDDPTVPDSDNTPTFASIVLRVHNERWEGVPFLLKAGKALNSRKAIRVQFKDVPGD
Clustal Co	: * : *

3.1.2 Determinazione della sequenza cyt-G6PDH da foglie

I dati presenti nella banca dati Genevestigator (www.genevestigator.com) permettono di individuare due contigs, il contig 3308 e il contig 3309, che rappresentano due isoforme citosoliche di orzo. In particolare l'isoforma citosolica rappresentata dal contig 3308 risulta essere quella più simile all'isoforma citosolica ottenuta da orzo in questo lavoro.

Le due isoforme citosoliche identificate in orzo presentano una differente espressione nei vari organi della pianta e nei differenti stadi di sviluppo (figura 3.4) .

Per valutare l'eventuale espressione e presenza di una diversa isoforma cyt-G6PDH nei tessuti fotosintetici rispetto a quella presente nei tessuti eterotrofi, il cDNA ottenuto da foglie veniva amplificato con i primers specifici utilizzati per ottenere la sequenza nelle radici.

Il risultato è un amplificato dal peso atteso (1767 bp) che codifica per una proteina di 509 amminoacidi.

Il confronto fra le due sequenze nucleotidiche codificanti ottenute da foglie e radici mostra due mutazioni puntiformi che non determinano cambiamenti nella sequenza amminoacidica, tale dato indica che questa isoforma è espressa in entrambi i tessuti nella stessa fase di sviluppo della pianta.

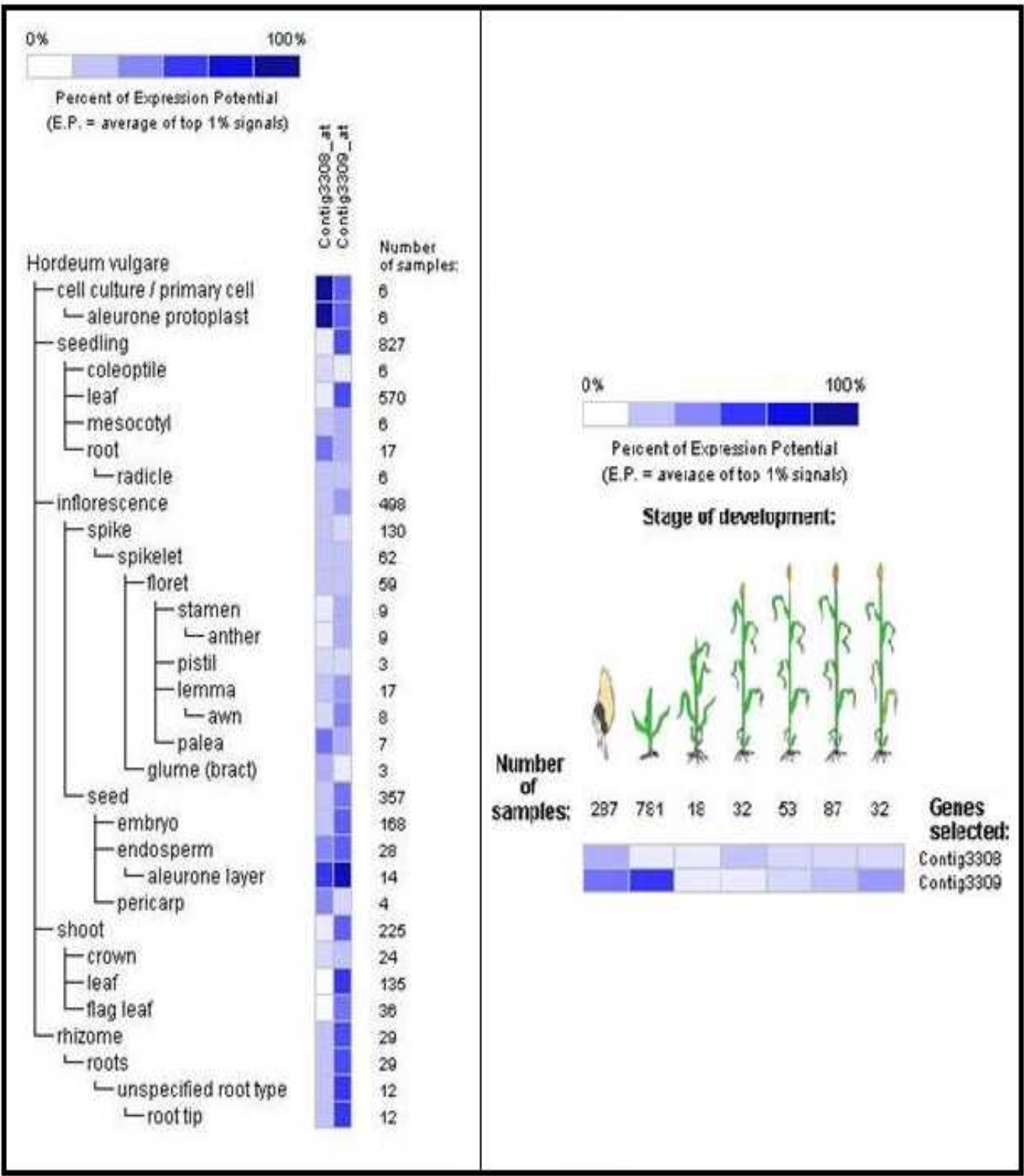


Figura 3.4: Analisi dei trascritti cyt-G6PDH in orzo nei diversi organi della pianta (a sinistra) e nei diversi stadi di sviluppo (a destra). I dati sono stati ottenuti usando il "meta-profile analysis tool in Genevestigator V3". Il colore blu indica up-regolazione ed il colore bianco indica down-regolazione. I dati sono espressi come log2. Per la descrizione riferirsi al testo.

3.1.3 Struttura tridimensionale putativa della cyt-G6PDH di orzo

La struttura tridimensionale della cyt-G6PDH (figura 3.5) è stata predetta con l'ausilio del software Swiss prot disponibile in rete. La struttura è stata predetta sulla base della determinazione cristallografica della G6PDH del batterio *Leuconostoc mesenteroides* (Cosgrove et al., 1998); è importante notare che questo organismo procariotico possiede una G6PDH bi-specifica, capace di legare sia il NAD^+ che il NADP^+ .

Lo studio della composizione in amminoacidi della sequenza, con l'ausilio del programma expasy tool, indica che la cyt-G6PDH è una proteina definita "instabile", con un peso molecolare di 57.8 KDa.

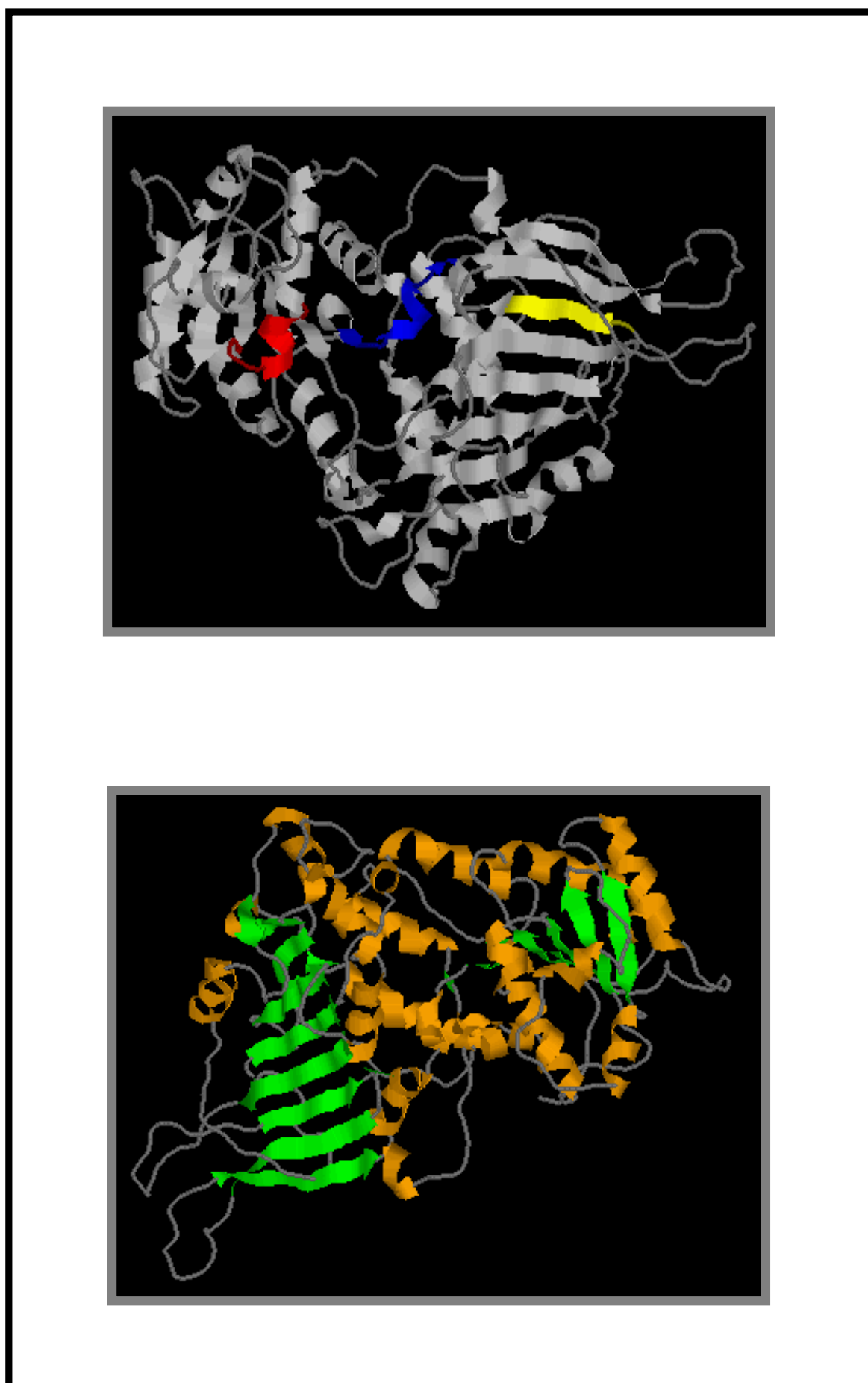


Figura 3.5: Struttura putativa della cyt-G6PDH di orzo. In alto l'immagine mostra i domini caratteristici della proteina cyt-G6PDH, in rosso è riportato la sequenza Rossman-fold, in blu il sito attivo ed in giallo il sito di legame per il NADP; in basso l'immagine mostra i foglietti beta e le alfa eliche evidenziati in verde e arancio rispettivamente che caratterizzano la struttura dell'enzima.

3.2 Overespressione e purificazione della cyt-G6DPH

Cellule *E.coli* del ceppo BL21(DE3) contenenti il plasmide ricombinante cyt-G6PDH-pET3d erano cresciute e le colonie ottenute selezionate mediante PCR (dato non mostrato) e mediante test di espressione (figura 6.3 in appendice), che verifica su gel di poliacrilammide la produzione della proteina ricombinante.

La colonia positiva scelta era fatta crescere e il lisato batterico analizzato mediante test di solubilità per valutare in quale frazione fosse presente la proteina ricombinante.

L'analisi SDS-PAGE (figura 6.4 in appendice) dei lisati batterici mostra la presenza della proteina sia nei corpi di inclusione (pellet), sia nella frazione solubile.

Il profilo di espressione proteico delle cellule ricombinanti era confrontato con quello di cellule controllo, ossia batteri trasformati con il plasmide nativo.

Sebbene la cyt-G6PDH ricombinante fosse presente anche nel pellet del lisato batterico, la proteina veniva purificata dalla frazione solubile, in quanto la quantità di enzima presente in questa frazione permetteva una buona resa mediante le convenzionali strategie biochimiche.

La frazione solubile del lisato batterico veniva desalata, e la proteina ricombinante purificata per cromatografia a scambio ionico applicando un gradiente 0-400 mM di NaCl (figura 3.6).

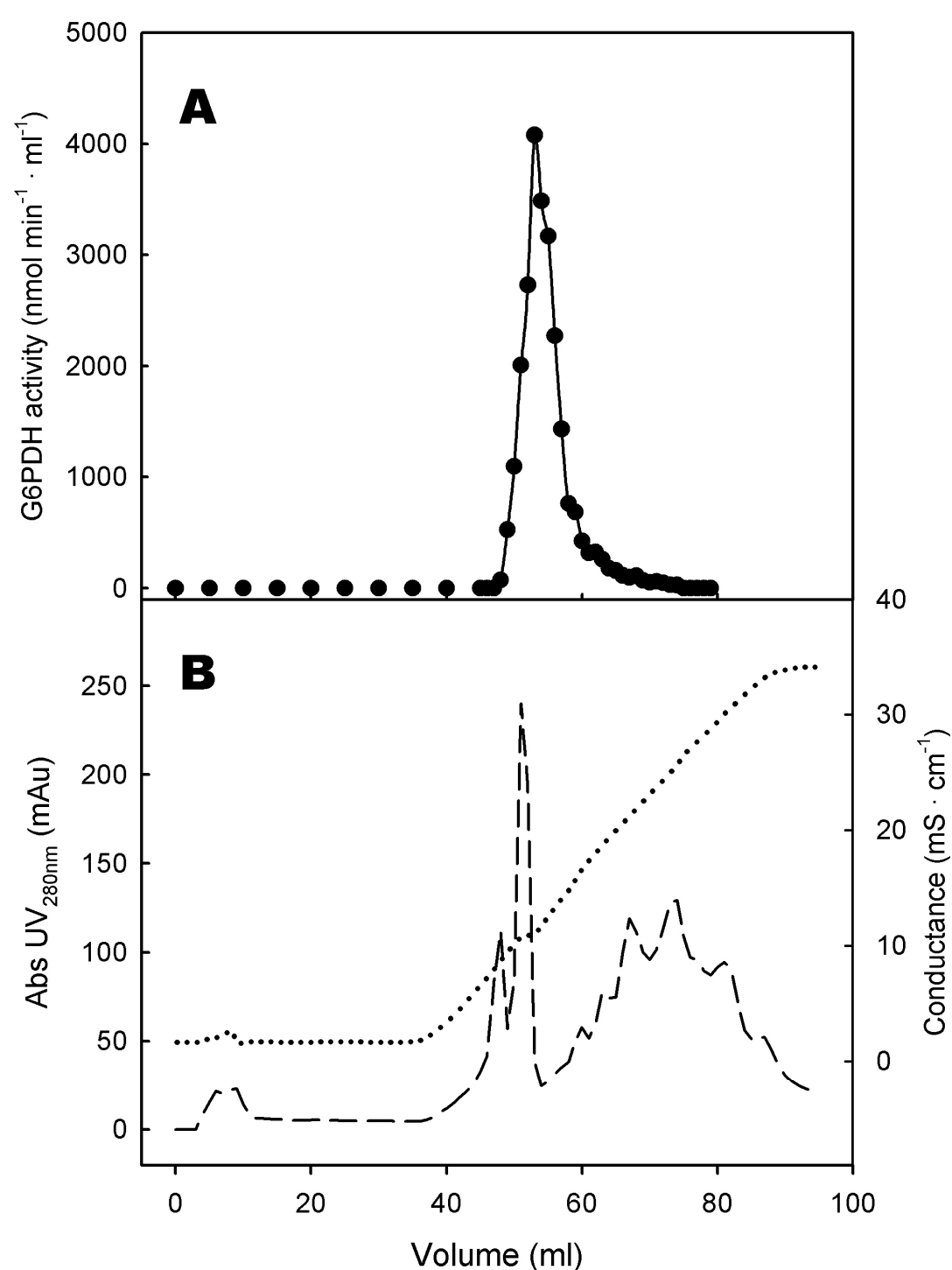


Figura 3.6 A) Profilo d'attività della proteina ricombinante Cyt-G6PDH (-•-) purificata ottenuta dalla colonna cromatografica a scambio ionico GE-Healthcare Resource Q sepharose. B) L'assorbimento UV (280 nm) che indica il profilo di eluizione totale di proteine è indicato dalla linea tratteggiata (----), la linea punteggiata (·····) indica la conduttanza ($\text{ms} \cdot \text{cm}^{-1}$) dovuta al gradiente di NaCl.

Le frazioni attive ottenute eluivano in un singolo picco di attività coincidente con il maggiore picco di proteine. Le frazioni centrali del picco di attività venivano riunite, desalate ed applicate ad una colonna per una cromatografia per affinità blu-agarose (figura 3.7). Anche in questo caso le frazioni attive eluivano in un solo picco di attività in seguito all'aggiunta di NADP^+ , il substrato dell'enzima G6PDH, e NaCl necessario per cambiare la forza ionica della colonna a cui l'enzima ricombinante è fortemente legata. Il passaggio sulla colonna di un tampone contenente NAD^+ è necessario per allontanare le eventuali altre deidrogenasi legate alla colonna che mostrano affinità per il NAD^+ , mentre l'uso di un tampone contenente NADP^+ 2 mM permette l'allontanamento di deidrogenasi debolmente legate alla colonna.

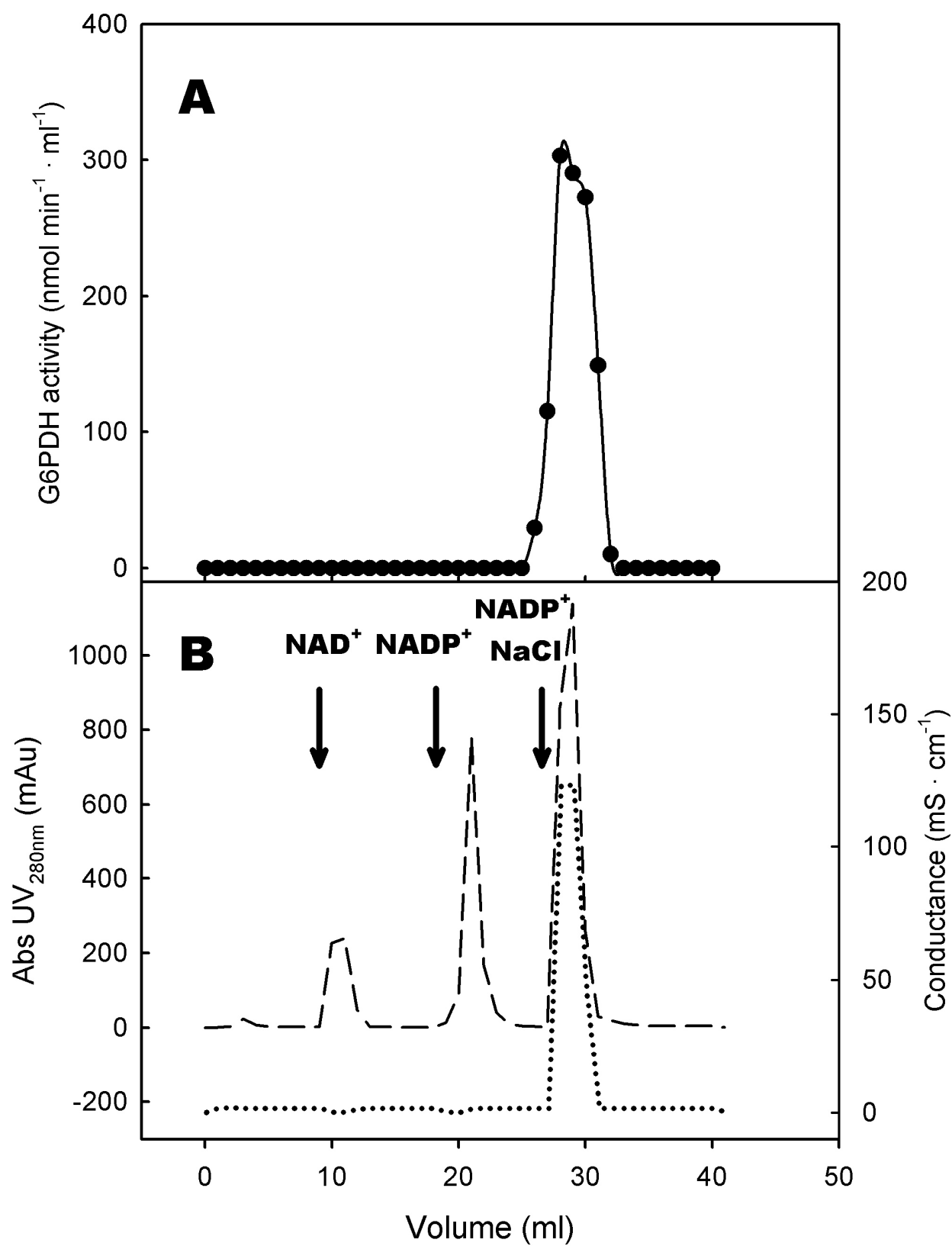


Figura 3.7: A) Profilo d'attività della proteina ricombinante cyt-G6PDH (-•-) purificata ottenuta da una resina cromatografica per affinità blu sepharose (colonna His-Trap Blue HP). B) L'assorbimento UV (280 nm) che indica il profilo di eluizione totale di proteine è indicato dalla linea tratteggiata (-----), la linea punteggiata (·····) indica la conduttanza ($\text{ms} \cdot \text{cm}^{-1}$) dovuta all'aggiunta di un tampone contenente NaCl.

La purezza e le caratteristiche immunologiche della proteina ricombinante purificata venivano controllate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide SDS-PAGE (figura 3.8) ed immunoblotting utilizzando anticorpi specifici diretti contro l'isoforma citosolica G6PDH (Wendt et al., 2000).

I picchi di attività ottenuti durante le varie fasi di purificazione venivano confrontati con un campione controllo. La proteina ricombinante mostrava un peso molecolare di 56 KDa, corrispondente a quello calcolato in funzione della sequenza amminoacidica.

Il gel SDS-PAGE mostrava che la proteina ottenuta con la cromatografia per affinità era sufficientemente pura per delle accurate misurazioni dei parametri cinetici.

L'analisi Western-blotting indicava una elevata specificità della proteina purificata ricombinante per gli anticorpi contro la cyt-G6PDH di patata, mentre non si osservava reazioni con gli anticorpi specifici per le isoforme compartimentale P1-P2-G6PDH (dato non mostrato).

La proteina ricombinante era presente in tutti i passaggi di purificazione.

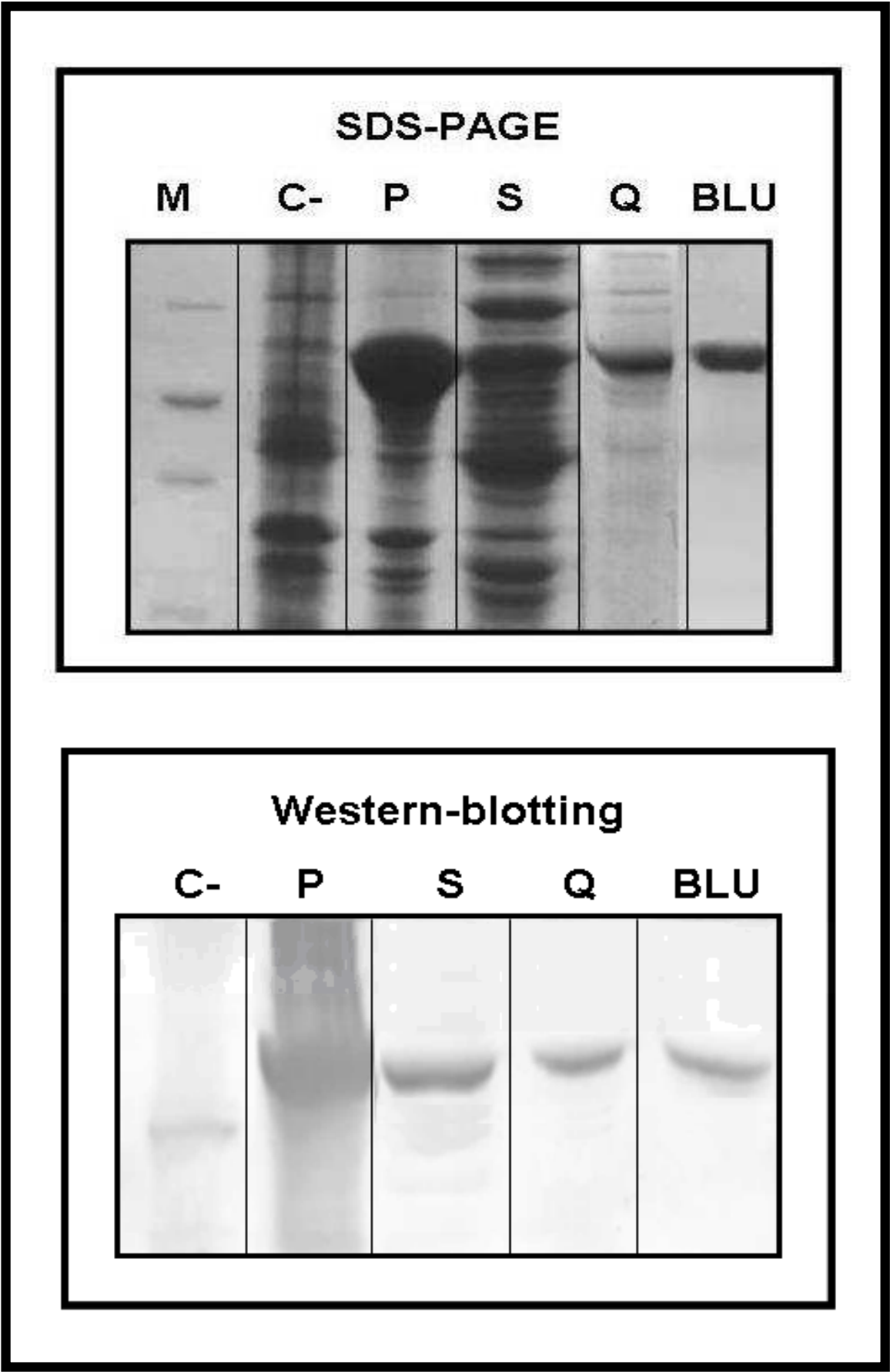


Figura 3.8 : Analisi dei campioni ottenuti durante gli step di purificazione della cyt-G6PDH. In alto elettroforesi su gel di poliacrilammide SDS-PAGE. In basso Western Blotting con l’uso di anticorpi specifici diretti contro la cyt-G6PDH.
Leggenda. C (controllo negativo); M (Marker); P (Pellet batterico); S (surnatante batterico); Q (eluato cromatografia a scambio ionico); Blu (eluato cromatografia per affinità).

3.2.1 Determinazione dei parametri cinetici della cyt-G6PDH

La proteina purificata ottenuta dalla cromatografia per affinità veniva desalata per allontanare il NADP^+ , e utilizzata per definire i parametri cinetici della cyt-G6PDH ricombinante.

Le costanti cinetiche per entrambi i substrati venivano misurate variando le concentrazioni di G6P da 0 a 3 mM; e le concentrazioni di NADP^+ da 0 a 150 μM (figura 3.9).

La G6PDH ricombinante di radici di orzo parzialmente purificata dalla frazione solubile del lisato batterico mostrava una cinetica iperbolica nei confronti del substrato glucosio-6P, con un valore di $K_{m \text{ G6P}}$ di $0.41 \pm 0.1 \text{ mM}$.

La cinetica di saturazione nei confronti del NADP^+ era di tipo iperbolico; il valore di K_m calcolato per il coenzima ossidato era di $13.2 \pm 2 \mu\text{M}$.

La costante di inibizione per il NADPH veniva valutata misurando l'attività enzimatica variando i livelli di inibitore da 0 a 150 μM a concentrazioni sub-saturanti di NADP^+ (15, 30, 50 μM), e mantenendo la concentrazione di G6P a 30 mM (figura 3.10).

L'inibizione da NADPH dava un valore di $K_{i \text{ NADP}^+}$ di $24.3 \pm 3 \mu\text{M}$, calcolato mediante il Plot di Dixon.

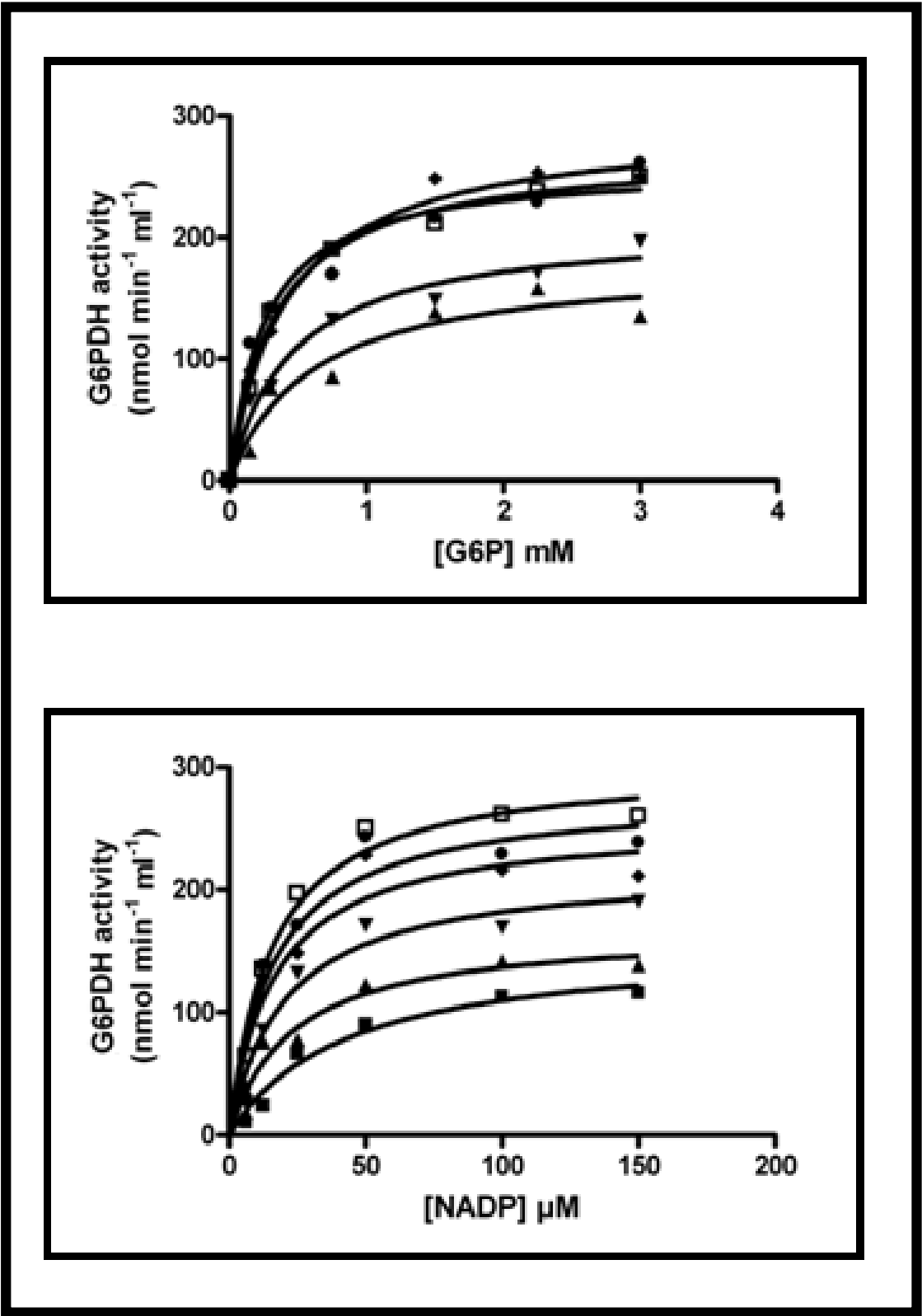


Figura 3.9: Proprietà cinetiche della proteina ricombinante cyt-G6PDH.
In alto $K_{m_{G6P}}$, effetto della variazione della concentrazione del G6P a diverse concentrazioni di $NADP^+$.
Legenda, $[NADP^+]$ = (▲) 6.125 μM ; (▼) 12.5 μM ; (◇) 25 μM ; (●) 50 μM ; (□) 100 μM ; (■) 150 μM ;.
In basso $K_{m_{NADP^+}}$, effetto della variazione della concentrazione del $NADP^+$ a diverse concentrazioni di G6P.
Legenda, $[G6P]$ = (■) 0.15mM; (▲) 0.3 mM; (▼) 0.75 mM ; (◇) 1.5 mM ; (●) 2.25 mM ; (□) 3 mM.

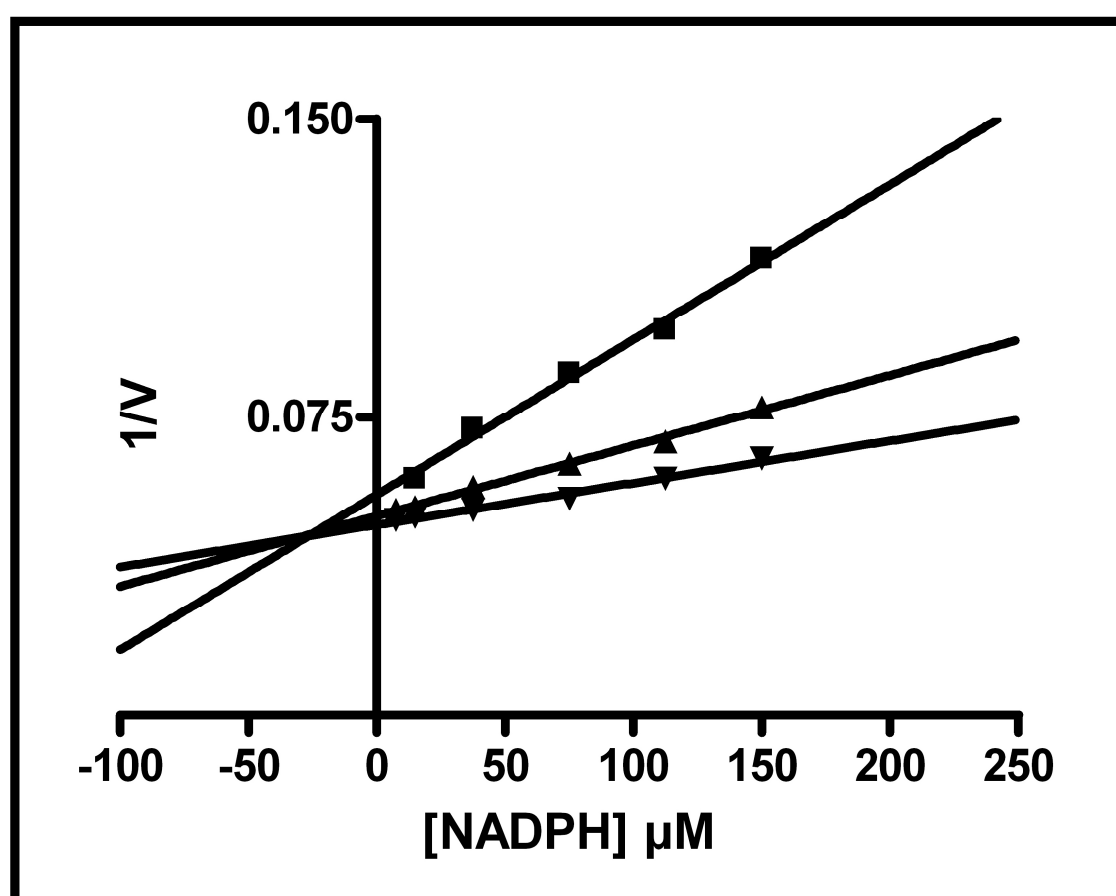


Figura 3.10: Proprietà cinetiche della proteina ricombinante cyt-G6PDH: Ki NADPH. La K_i è stata determinata a 3 mM G6P utilizzando concentrazioni $NADP^+$ non saturanti: (\blacksquare) 15 μM $NADP^+$; (\blacktriangle) 30 μM $NADP^+$; (\blacktriangledown) 50 μM $NADP^+$.

Le costanti cinetiche della proteina ricombinante ottenute venivano confrontate con quelle misurate sulla proteina nativa purificata da radici piante d’orzo (Esposito et al., 2001a e 2001b), verificando così che i parametri cinetici erano sostanzialmente simili (Tabella 3.2).

	Km_{G6P} mM	Km_{NADP+} μ M	Ki_{NADPH} μ M
cyt-G6PDH Ricombinante	0.41 ± 0.1	13.6 ± 2	24.3 ± 3
cyt- G6PDH * Radici orzo	0.5 ± 0.1	9 ± 2	15 ± 3

Tabella 3.2: Parametri cinetici dell’enzima ricombinante cyt-G6PDH confrontati con i parametri cinetici della cyt-G6PDH purificata da radici di orzo. (*= da Esposito et al., 2001a, 2001b).

Le caratteristiche cinetiche della proteina ricombinante cyt-G6PDH erano confrontate con quelle misurate sulla proteina G6PDH di *E.coli* purificata per controllo nei batteri BL21 (DE3) trasformati con un plasmide pET3d nativo dimostrando una sostanziale differenza: $Km_{G6P} = 0.175$ mM , $Km_{NADP+} = 2.1$ μ M, $Ki_{NADPH} = 8.8$ μ M.

3.3 Regolazione dell'attività della cyt-G6PDH da zuccheri

L'attività G6PDH è stata misurata in radici e foglie di piante cresciute in presenza di 50 mM fruttosio aggiunto al terreno di crescita e i valori ottenuti confrontati con attività misurate su radici e foglie di piante controllo (senza aggiunta di zucchero) (figura 3.11).

Gli estratti grezzi venivano trattati con 60 mM di DTT per 45 minuti in modo da inibire l'attività delle isoforme P1- e P2-G6PDH, regolate dal potere riducente. Pertanto l'attività della G6PDH misurata in presenza di DTT può essere attribuita alla sola isoforma citosolica, insensibile a tale regolazione.

Nelle foglie si osserva che l'attività della G6PDH citosolica aumentava di circa il 50% entro le 24-48 ore per tornare a valori paragonabili a quelli iniziali a 72 ore dall'aggiunta di fruttosio.

Nelle radici si osservava invece un incremento più repentino dell'attività della cyt-G6PDH di circa il 50% già dopo 6 ore dall'aggiunta di fruttosio i livelli alti di attività cyt-G6PDH rimanevano elevati e crescevano fino alle 48 ore quando era misurato un incremento 60 % dell'attività. A 72 h l'attività nelle radici era ancora oltre il 30% superiore a quella iniziale.

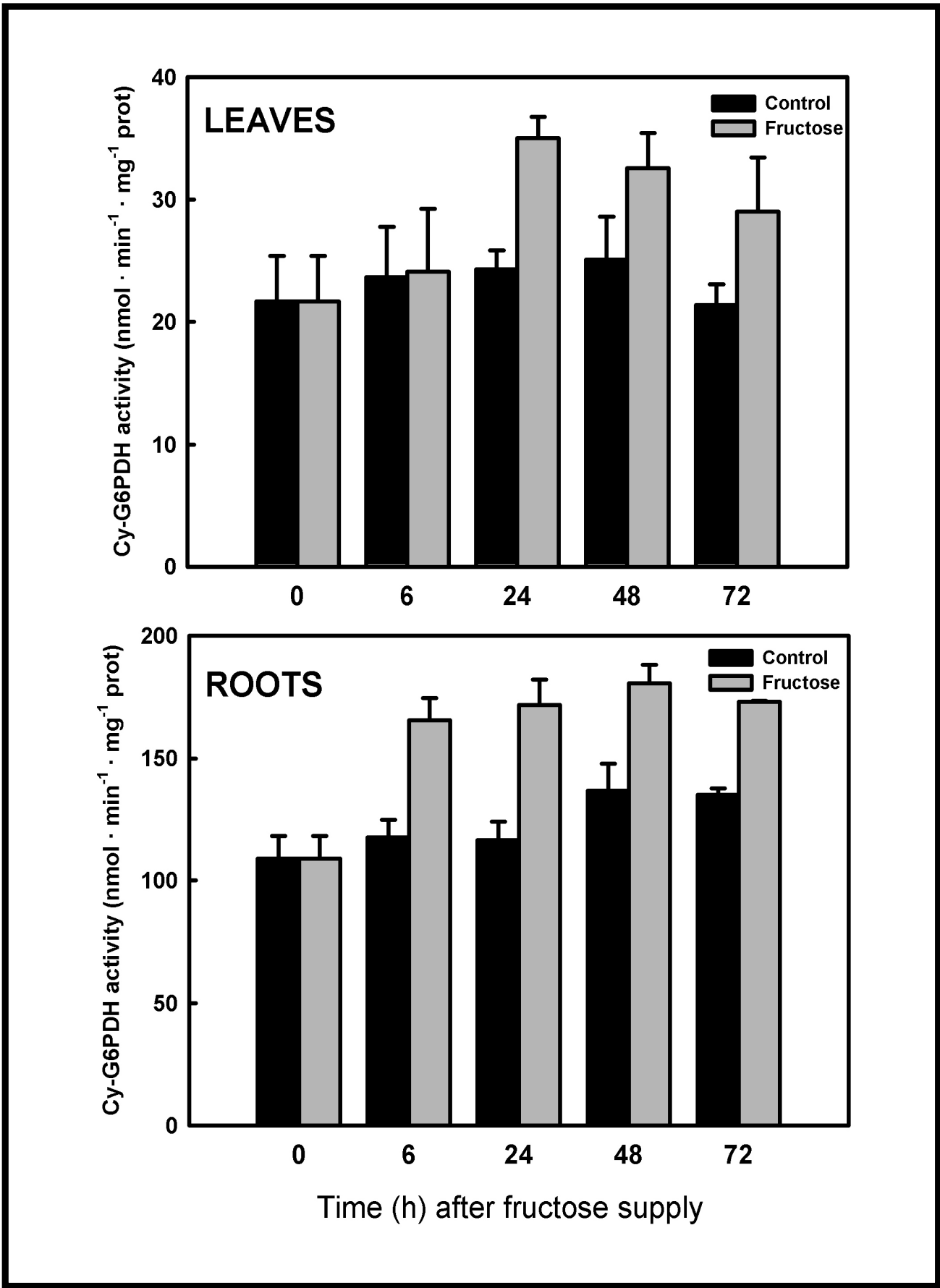


Figura 3.11: Attività cyt-G6PDH in piante trattate con l’aggiunta di fruttosio 50 mM al terreno di crescita. In alto attività calcolata in foglie. In basso attività calcolata in radici. Le piante controllo erano cresciute senza l’aggiunta di zucchero.

3.4 G6PDH e stress biotico

I dati presenti nella banca dati Genevestigator indicano che le due isoforme citosoliche di orzo individuate dai contigs 3308 e 3309 sono differentemente espresse nelle varie condizioni di stress.

In particolare il contig 3308, che risulta essere più simile all'isoforma isolata in questo progetto, è fortemente up-regolata in seguito all'attacco patogeno da parte di *Blumeria graminis* (Figura 3.12).

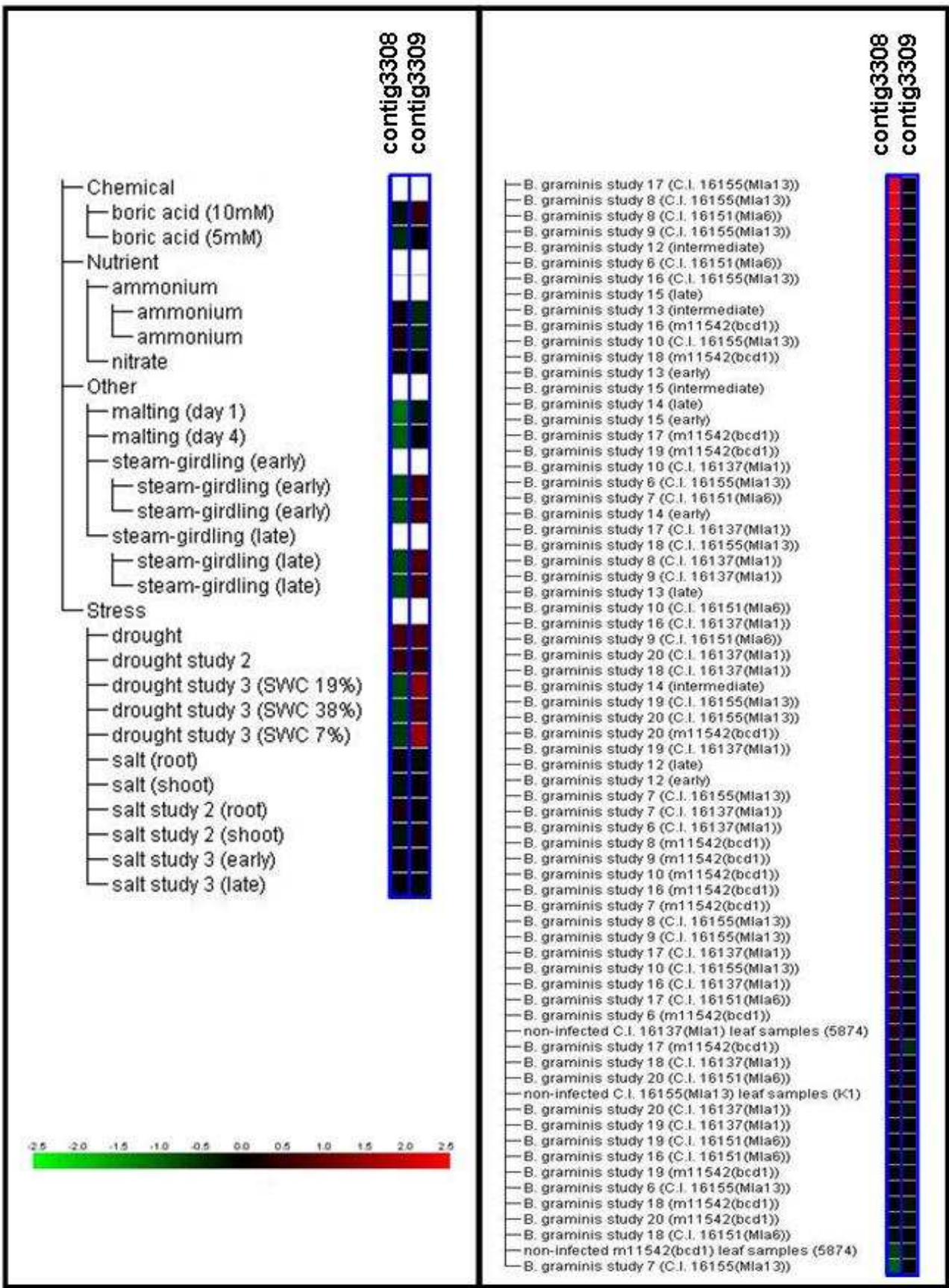


Figura 3.12: Analisi dei trascritti cyt-G6PDH in orzo in differenti condizioni di stress abiotici (a sinistra) e di stress biotico causato dall’attacco del patogeno *Blumeria graminis*. I dati sono stati ottenuti usando il "meta-profile analysis tool in Genevestigator V3". Il colore rosso indica up-regolazione ed il colore verde indica down-regolazione. I dati sono espressi come log2. Per la descrizione riferirsi al testo.

Il coinvolgimento dell'isoforma citosolica della G6PDH nei meccanismi di difesa in piante sia resistenti che suscettibili in seguito all'attacco di *Bgh*, è stato valutato mediante analisi Real-time PCR.

Le due linee selezionate, *Manchuria* MLA1 e *Manchuria* MLA6, mostrano, rispettivamente, resistenza e suscettibilità, nei confronti dell'isolato K1 di *Blumeria graminis*.

Nei primi tre giorni dall'infezione sulle foglie non si notavano segni visibili della presenza del fungo, sia in piante resistenti che suscettibili.

A sette giorni dall'inoculo sulle superficie fogliaria della linea suscettibile (MLA6) si osservano le tipiche macchie di infezione, che indicavano la propagazione del fungo, le spore fungine erano invece assenti sulle foglie della linea resistente (MLA1) (Figura 3.13).

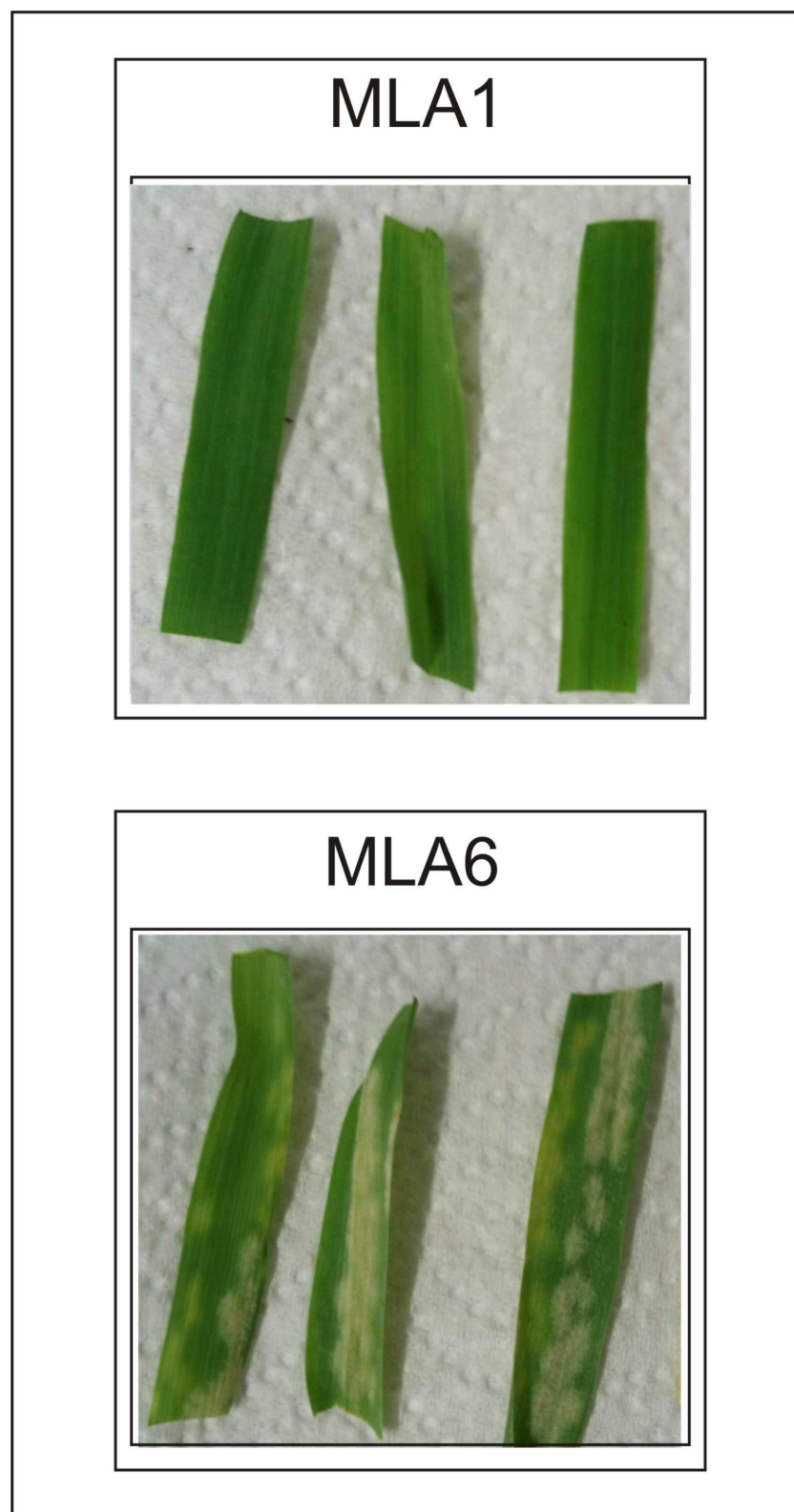


Figura 3.13: Effetti macroscopici su foglie di piante di orzo dopo sette giorni dall'infezione con il ceppo K1 di *Blumeria graminis*. In alto la linea *Manchuria* MLA1 (resistente); in basso *Manchuria* MLA6 (suscettibile).

L'analisi Real-Time PCR su campioni di foglie ottenute dalle due linee di piante e comparata con piante controllo mostra differenti livelli di incremento dei livelli di trascritto *cyt-G6PDH* nelle due linee.

Nella linea di piante resistenti (MLA1) si osserva un incremento dopo 12 ore dei livelli di espressione di 3.3 volte rispetto ai campioni controllo, tale incremento è pressoché costante dopo 24 ore (2.7 volte); successivamente nell'arco delle 48 ore i livelli di trascritto tornano ai livelli basali.

Nella linea di piante suscettibili (MLA6) si osserva un minore, e transiente, incremento dei livelli di trascritti *cyt-G6PDH* dopo 12 ore di un valore di 2.6 volte rispetto alle piante controllo non infette, e già dopo 24 ore i livelli di trascritto *cyt-G6PDH* tornavano ai livelli basali e di controllo (figura 3.14).

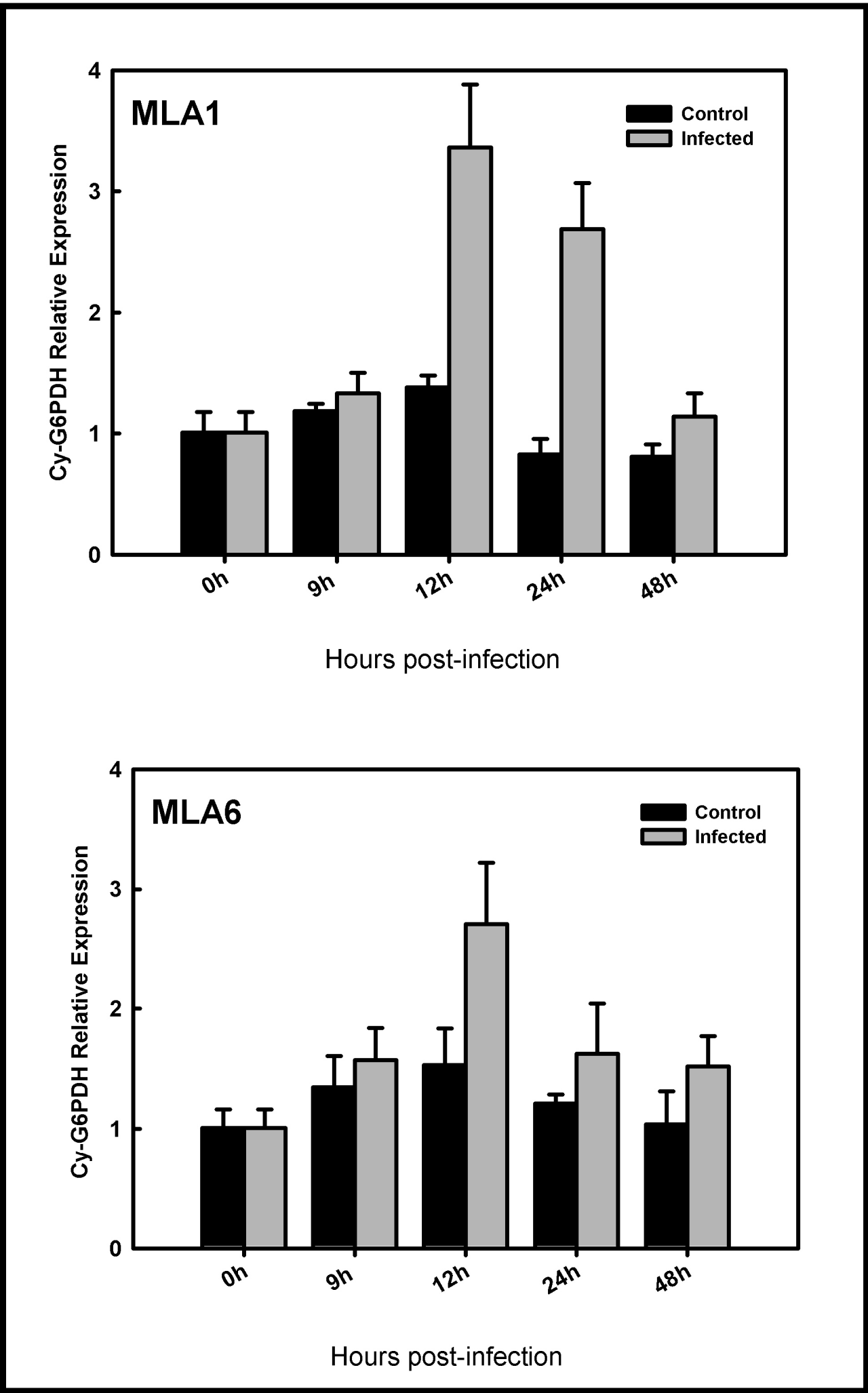


Figura 3.14: Analisi Real-time. Livelli di espressioni dell'isoforma cyt-G6PDH dopo infezione con *Blumeria graminis* sp *hordei* K1. In alto livelli di espressione in piante resistenti (*Manchuria* MLA1). In basso livelli di espressione in piante suscettibili (*Manchuria* MLA6).

CAPITOLO 4

4.1 Discussione

Il ruolo primario occupato dal ciclo dei pentosi fosfati (OPPP) nel metabolismo cellulare fa di questa via uno snodo fondamentale sia nella produzione di potere riducente (NADPH) necessario per le biosintesi, sia nella formazione di importanti precursori delle principali vie metaboliche.

Nelle cellule vegetali le funzioni di questo ciclo risultano ulteriormente ampliate: recentemente, è stato proposto un coinvolgimento di tale via metabolica nella risposta agli stress biotici (Sindelar *et al.*, 1999) e abiotici (Bredemeijer e Esselink, 1995; Nemoto e Sasakuma, 2000; Wang *et al.*, 2008). Le piante, a causa della loro maggiore esposizione agli agenti atmosferici sono fortemente suscettibili a limitazioni di acqua e nutrienti nonché alle variazioni metereologiche; inoltre sono soggette all'attacco di batteri, funghi, insetti ed erbivori: la sessilità degli organismi vegetali impedisce infatti loro di fuggire dall'attacco di patogeni e predatori. Queste caratteristiche hanno portato le piante a sviluppare una complessa rete di rilevamento e risposta agli stress ambientali e biotici al fine di garantire la sopravvivenza del singolo organismo e della specie in un determinato ambiente.

In tale contesto le vie metaboliche nelle piante assumono forza e significati diversi rispetto a quanto convenzionalmente descritto

nelle cellule animali, e la via OPPP rappresenta un chiarissimo esempio di questa affermazione.

Da molti anni è stata suggerita l'esistenza di un ciclo OPPP nel citoplasma ed uno nei plastidi sia nei tessuti fotosintetici sia nei tessuti eterotrofi (Kruger e von Schaewen, 2003), anche se alcuni enzimi di questa via metabolica non sono presenti nel citosol (Schnarrenberger *et al.*, 1995; Debnam e Emes, 1999) suggerendo quindi la presenza di un ciclo completo nei plastidi e di un ciclo incompleto nel citosol.

La glucosio-6P deidrogenasi rappresenta l'enzima chiave dell'OPPP, e insieme alla 6P-gluconato deidrogenasi caratterizza la prima e più importante fase del ciclo, rappresentata dalla produzione del NADPH.

La G6PDH è un omotetramero con subunità di 50-60 KDa, in molti tessuti vegetali è stata dimostrata la presenza di differenti isoforme a localizzazione citosolica e plastidiale (Schnarrenberger *et al.*, 1973; Nishimura e Beevers, 1981; Wendt *et al.*, 2000; Wakao e Benning, 2005). Questa evidenza è stata confermata nelle radici di orzo (Esposito *et al.*, 2001a, 2001b), dove i due enzimi possono essere separati da una cromatografia a scambio anionico e distinte in base alle differenti proprietà cinetiche (Esposito *et al.*, 2001b, 2005).

Nelle piante le isoforme G6PDH sono soggette a differenti regolazioni: l'isoforma cloroplastica (P1-G6PDH) è sotto il controllo della luce ed è suscettibile al rapporto NADPH/NADP⁺ (Lendzian, 1980; Fickenscher e Scheibe, 1986) e controllata dalle tioredossine (Née *et al.*, 2009); questo effetto è mediato da due

cisteine presenti all’N-terminale della proteina (Wenderoth et al., 1997).

L’esistenza di una seconda isoforma plastidiale (P2-G6PDH) è stata dimostrata sia in dicotiledoni (Wendt et al., 2000) che monocotiledoni (Esposito et al., 2001a); questo enzima, espresso in gran parte dei tessuti della pianta (Wendt et al., 2000; Wakao e Benning, 2005), riveste un ruolo fondamentale durante l’assimilazione del nitrato nei tessuti non –fotosintetici (Esposito et al., 2001b, Esposito et al., 2003, Wang et al., 2008), e durante la sintesi degli acidi grassi (Hutchings et al., 2005).

Questa isoforma si distingue dalla P1-G6PDH per alcune caratteristiche cinetiche, come una più bassa sensibilità al NADPH, evidenziata da valori elevati della $K_{i\text{NADPH}}$ e una minore suscettibilità ai riducenti artificiali (DTT); queste caratteristiche rivestono particolare interesse sia da un punto di vista metabolico, suggerendo un possibile funzionamento della OPPP nei cloroplasti alla luce in condizioni di elevata nutrizione azotata (Esposito et al., 2005); sia da un punto di vista biochimico e molecolare, infatti la P2-G6PDH conserva le due cisteine regolatrici indicate come responsabili della regolazione redox nella stessa posizione dell’isoforma cloroplastica (Wendt et al., 2000).

L’isoforma citosolica è coinvolta nel metabolismo basale delle piante (Esposito et al., 2005), e la sua espressione sembra aumentare in presenza di zuccheri suggerendo una regolazione “sugar-sensing” (Haushild e von Schaewen, 2003). Tale isoforma presenta insensibilità ai riducenti artificiali quali ad esempio DTT

(Esposito et al., 2001a; Graeve et al., 1994) suggerendo di non essere sottoposta al controllo del sistema ferredossina - tioredossina.

In questo progetto di ricerca è stata sequenziata, caratterizzata e descritta l'isoforma citosolica della G6PDH da radici di orzo.

La sequenza cyt-G6PDH è stata ottenuta amplificando il cDNA da radici di orzo prima con primers degenerati che hanno prodotto un frammento di 330 coppie di basi e poi con l'utilizzo di primers specifici. I primers degenerati sono stati disegnati sulla base di sequenze conservate individuate in seguito ad un allineamento multiplo tra sequenze G6PDH note, invece i primers specifici venivano disegnati sulla base di una sequenza EST, di orzo, presente in banca dati con la quale la sequenza di 330 coppie di basi, ottenuta precedentemente, mostra un'identità del 100%.

La sequenza ottenuta è costituita da 1767 coppie di basi e codifica per una proteina di 509 residui amminoacidici.

Tale proteina presenta, in accordo con le G6PDH note, importanti domini funzionali altamente conservati quali il sito attivo caratterizzato dalla sequenza YRIDHYLGK, il sito di legame del NADP^+ ed il Rossman-fold. Tale motivo strutturale è caratteristico di molte deidrogenasi e rappresenta il sito di legame del cofattore NAD(P)^+ . Inoltre a differenza delle isoforme plastidiali la G6PDH citosolica non presenta le tipiche due cisteine regolatrici né ovviamente il peptide di transito.

La sequenza cyt-G6PDH ottenuta da radici di orzo è stata allineata con diverse sequenze di G6PDH rappresentative delle diverse famiglie di organismi fotosintetici; l'albero filogenetico

costruito con 37 sequenze amminoacidiche derivato da quest'analisi bioinformatica, mostra tre rami principali corrispondenti alle sequenze citosoliche degli eucarioti; il secondo ramo le sequenze di batteri, cianobatteri e diatomee; un terzo ramo le isoforme compartimentate delle piante che si suddivide ulteriormente nelle classi P1 e P2.

Le isoforme compartimentate delle alghe verdi e rosse si raggruppano con le sequenze plastidiche e si diramano prima della separazione nelle due classi P1 e P2 delle piante.

I dati suggeriscono che negli organismi fotosintetici unicellulari esiste una sola isoforma cloroplastica oltre alla G6PDH citosolica. Quindi è possibile che in concomitanza con lo sviluppo dei fotoautotrofi multicellulari, e il successivo redifferenziamento delle cellule vegetali con cloroplasti in cellule non fotosintetiche nelle piante e briofite, si sia verificata la separazione nelle due classi plastidiali P1 e P2 nelle piante. La assenza di attività fotosintetica in tali cellule avrebbe causato la minore sensibilità al NADPH delle isoforme P2 rispetto alle P1-G6PDH.

Negli Archea non può essere individuata alcuna attività enzimatica G6PDH. Sono possibili due spiegazioni su tale assenza negli archeobatteri: l'enzima è stato perso nell'antenato comune degli archeobatteri, oppure l'enzima si è formato nella linea evolutiva degli eubatteri per essere trasferito quindi lateralmente agli eucarioti prima della divergenza della maggior parte dei gruppi esistenti (Orita et al., 2006).

Inoltre è stato verificato che le isoforme G6PDH citosoliche e plastidiali delle piante superiori mostrano una maggiore

omologia fra loro rispetto a quella che si verifica tra le isoforme eucariotiche plastidiali e quelle procariotiche con analoga regolazione redox (cianobatteri).

Tutti questi aspetti suggeriscono un possibile scenario evolutivo per le isoforme compartimentate della G6PDH.

I cloroplasti derivano da cianobatteri, e conservano parte dell'antico genoma eubatterico, in ogni caso, dal punto di vista funzionale hanno conservato parte del loro metabolismo eubatterico. La discrepanza tra il numero di geni che codificano gli organelli e il numero di proteine eubatteriche che essi contengono è spiegato come il trasferimento di geni endosimbiontico. Questo processo, nel corso del tempo, ha concentrato materiale genetico nei cromosomi nucleari. Nel corso dell'evoluzione, parte dei geni eubatterici sono stati trasferiti nel nucleo della cellula eucariotica; questo processo richiede l'inserimento di peptidi di transito per l'importazione negli organelli.

Dal punto di vista genetico questo processo si traduce in un sistema eucariotico di regolazione genica sotto il controllo del nucleo piuttosto che dagli organelli geneticamente semiautonomi (Martin e Herrmann, 1998).

Nel caso della G6PDH, è stato proposto che durante l'endosimbiosi che ha portato alla apparizione dei cloroplasti negli eucarioti, il gene della G6PDH dell'antenato cianobatterico è stato sostituito da una copia codificata dal nucleo, in seguito alla duplicazione del gene citosolico e il reclutamento di un peptide

di transito per l'indirizzamento nel cloroplasto (Wendt et al., 1999).

Un caso particolare è rappresentato dalle diatomee, infatti in questo gruppo i cloroplasti si sono originati dalle alghe rosse, organismi eucariotici. Durante l'evoluzione, i cloroplasti delle diatomee hanno perso il gene per la G6PDH che però in questo caso non è stato rimpiazzato da alcun gene nucleare. Infatti nelle diatomee sono state ritrovate solamente isoforme G6PDH citosoliche (Michels et al., 2005).

Si può quindi concludere che le differenti isoforme della G6PDH delle piante superiori derivano tutte da un comune antenato eubatterico. Risulta però estremamente interessante il processo di compartimentazione nei cloroplasti, che deve avere previsto almeno due distinte serie di eventi: l'aggiunta di un peptide di transito per l'ingresso negli organelli; e la acquisizione della capacità di regolazione redox conferita dalle due cisteine in posizione 149-156 (Wendt et al., 1999).

Una ulteriore e interessante evoluzione di tale processo è stato il successivo differenziamento delle isoforme strettamente cloroplastiche (P1-G6PDH), e presenti solo nelle cellule fotosintetiche, rispetto alle isoforme plastidali (P2-G6PDH) generalmente espresse in quasi tutti i tessuti delle piante superiori (Wendt et al., 2000; Wakao e Benning 2005).

Gli allineamenti effettuati tra la sequenza ottenuta da orzo e le altre G6PDH note, mostrano, oltre all'appartenenza di tale sequenza al cluster delle isoforme citosoliche, anche la sua forte

identità (94%) con la G6PDH citosolica di grano (*Triticum aestivum*) suggerendo quindi che la sequenza è molto conservata tra le due specie di cereali entrambe dicotiledoni (famiglia Graminaceae).

Successivamente la sequenza codificante per la cyt-G6PDH di orzo è stata inserita in un vettore di espressione al fine di ottenere la proteina ricombinante.

Il plasmide contenente la sequenza nucleotidica è stata sequenziato confermando che il frammento era stato inserito nella corretta cornice di lettura (*in frame*) per la produzione di una proteina funzionale.

La proteina ricombinante ottenuta era purificata dalla frazione solubile del lisato batterico mediante cromatografia a scambio anionico seguita da una cromatografia per affinità; nonostante parte della proteina ricombinate si localizzasse nel pellet (corpi di inclusione) derivante dalla centrifugazione dei lisati batterici, la proteina era sufficientemente presente nella frazione solubile, così da poter essere purificata in quantità sufficienti adeguate per valutare le costanti cinetiche e gli altri parametri biochimici di questa isoforma.

L'effettiva presenza e attività della cyt-G6PDH in ogni passaggio della procedura di purificazione veniva controllato mediante saggi enzimatici, analisi elettroforetica SDS-PAGE e western blotting utilizzando anticorpi specifici (Wendt et al 2000).

Lo studio delle caratteristiche cinetiche della proteina ricombinate cyt-G6PDH mostra valori paragonabili all'isoforma

nativa isolata da radici di orzo (Esposito et al., 2001a, 2001b, 2005).

L'isoforma citosolica G6PDH ottenuta rappresenta molto probabilmente solo una delle isoforme citosoliche presenti in orzo; infatti in diversi organismi vegetali sono stati trovati più geni codificanti per una stessa isoforma G6PDH, questo dato fa presupporre che anche in orzo ci siano più isoforme citosoliche G6PDH espresse in differenti tessuti, stadi di sviluppo, condizioni di crescita o di stress come suggerito anche dai dati forniti dal database "genevestigator".

Nei dati genevestigator in orzo possono essere identificati due diversi contigs, 3308 e 3309, simili alla cyt-G6PDH di *Triticum aestivum* e di *Oryza sativa*, rispettivamente che potrebbero corrispondere a due diverse isoforme citosoliche. Il contig 3308 è altamente espresso nelle cellule primarie nel protoplasto dell'aleurone, invece il contig 3309 è espresso nelle stelo e nelle foglie. È interessante notare che le due differenti isoforme citosoliche descritte in *Arabidopsis thaliana* (Wakao e Benning, 2005) sono distribuite nei diversi tessuti in modo analogo.

Lo studio dei "contig" esaminati da genevestigator indica che la sequenza cyt G6PDH ottenuta da radici di orzo in questo studio dovrebbe essere rappresentata dal contig 3308, isoforma espressa a livelli bassi nelle foglie.

In base a tali considerazioni, cDNA ottenuto delle foglie di orzo è stata amplificato con gli stessi primers utilizzate per l'isolamento della isoforma citosolica da cDNA di radici. La sequenza cyt-G6PDH di foglie mostra due mutazioni puntiformi neutre nella

sequenza nucleotidica rispetto alla sequenza ottenuta da radici che non indicano nessuna differenza funzionale, infatti la sequenza amminoacidica risulta identica rispetto a quella descritta nelle radici nello stesso stadio di sviluppo e nelle stesse condizioni di crescita. Questo risultato suggerisce la presenza dello stessa isoforma nel citosol di entrambi gli organi della pianta e nello stesso stadio di sviluppo; sarà necessario indagare ulteriormente sia sui livelli di espressione, sia sulla possibile presenza di altre eventuali isoforme citosoliche.

Inoltre per comprendere i meccanismi che regolano l'enzima citosolico G6PDH è stata indagata *in vivo* l'espressione della cyt-G6PDH di piante esposte ad infezione da parte di *Blumeria graminis*, e l'attività dell'enzima in presenza di una fonte esogena di zucchero.

Blumeria graminis f. sp. hordei è un patogeno che causa la patologia detta mal bianco nell'orzo determinando una consistente perdita del raccolto. Lo studio e la comprensione dei meccanismi che caratterizzano e regolano tale tipo di interazione risultano essere interessanti al fine di individuare o creare linee di orzo resistenti all'infezione da parte di *Bgh*.

L'analisi globale dei livelli di trascritti di orzo mostra che sia in piante suscettibili, dove si manifesta la patologia, sia in piante resistenti, dove la patologia non si manifesta, nelle prime 16 ore dall'infezione, coincidenti con la germinazione delle conidiospore e la crescita del tubo germinativo, si ha un identico profilo di espressione. Solo successivamente, tra le 16 e le 32

ore, coincidenti con la penetrazione del fungo nelle cellule epidermiche della pianta e con la formazione dell'austorio, si osserva tra le due linee piante un cambiamento nei livelli di espressione di alcuni geni che determinano cambiamenti metabolici (Caldo et al., 2004).

Questo dato indica una risposta aspecifica della pianta immediatamente dopo l'attacco patogeno, cioè quando durante la fase di germinazione il fungo rilascia proteine, carboidrati, lipidi, glicoproteine e peptidi dalle spore che inducono ad una reazione generale di difesa da parte della pianta. Nelle ore successive, quando il patogeno penetra nelle cellule dell'ospite, rilascia i geni di virulenza (AVR) questi in piante resistenti vengono riconosciuti dai geni R della pianta e determinano la risposta specifica che richiede un cambiamento nel pathway metabolico e la necessità da parte della pianta di mantenere alti i livelli di trascrizione di alcuni geni coinvolti appunto nella difesa, il non riconoscimento dei geni AVR nelle piante suscettibili impedisce la risposta specifica, ne consegue il ritorno dei livelli di trascritti a condizioni basali e la successiva manifestazione della patologia.

Il ciclo dell'OPPP sembra svolgere un ruolo importante durante la difesa della pianta in quanto risulta essere fonte del potere riducente necessario durante la difesa. Risulta quindi interessante verificare il possibile coinvolgimento dell'isoforma citosolica G6PDH nei meccanismi di difesa, sia in piante resistenti che in piante suscettibili.

A tale scopo sono state selezionate due linee trasgeniche di orzo del cultivar *Manchuria*: una introgressata con MLA1 (Zhou et al., 2001) e l'altra con MLA6 (Halterman et al., 2001) che presentano rispettivamente massima resistenza e suscettibilità all'isolato K1 di *Bgh* che produce fra i suoi effettori AVRMLA1 ma non AVRMLA6. I geni MLA sono geni resistenza R che codificano per proteine che differenziano fra loro nella regione di riconoscimento LRR.

L'analisi morfologica indica la comparsa delle spore fungine già dopo sette giorni dall'infezione sulla linea MAL6, le spore sono presenti lungo tutta la foglia e mostrano il tipico aspetto polveroso di colore biancastro.

Nei giorni successivi l'infezione sulla linea MLA6 si propaga fino a ricoprire completamente le foglie, mentre le foglie della linea MLA1 mostrano totale integrità.

L'analisi Real time mostra che in entrambe le linee di pianta si ha un aumento dei trascritti dell'isoforma cyt-G6PDH nell'arco delle 24 ore con un picco massimo dopo 12 ore dall'infezione. Tale aumento è maggiore nelle piante della linea MLA1 resistenti ed inoltre in queste piante i livelli di trascritti G6PDH perdurano ad alti livelli anche a 24 ore quando cioè inizia la formazione dell'austori. L'aumento in entrambe le linee di piante entro le 12 ore, nelle prime fasi dell'attacco patogeno sulla foglia, indica la risposta immediata e aspecifica in seguito alla presenza del fungo, ma il perdurare fino alle 24 ore di alti livelli di trascritti solo nelle piante resistenti indica il coinvolgimento dell'isoforma citosolica G6PDH nella risposta specifica determinata dal

riconoscimento tra geni R della pianta e geni AVR del patogeno (MLA1/AVRMLA1). Tali meccanismi richiedono maggiore potere riducente generato dall'OPPP e ciò giustifica i maggiori livelli di trascritto cyt-G6PDH nelle piante MLA1 necessari per sopperire proprio alle esigenze della pianta. Questi risultati indicano quindi il coinvolgimento dell'isoforma citosolica G6PDH nei meccanismi di difesa sia aspecifici che specifici.

Nelle piante gli zuccheri oltre ad essere una fonte di energia sono anche importanti regolatori in molti processi come la crescita, la maturazione e la senescenza.

Una ampia varietà di geni risulavano regolati da zuccheri semplici come glucosio, fruttosio, saccarosio, trealosio, a livello trascrizionale, includendo geni coinvolti nella fotosintesi, nel metabolismo del carbonio e dell'azoto, nelle risposte a stress e nel metabolismo secondario (Rolland et al., 2006).

Questi zuccheri probabilmente si comportano come messaggeri primari della percezione (*sensing*) e trasduzione (*signaling*) del segnale (Rolland et al., 2002), costituendo quindi vie di traduzione del segnale dette appunto "sugar sensing" (Sheen et al., 1999).

La sensibilità di determinati geni agli zuccheri è determinata dalla presenza di elementi sui promotori definiti Sugar Responsive Elements (SURE), che sono stati identificati e descritti in un gran numero di specie vegetali.

Studi recenti hanno evidenziato che gli zuccheri sembrano svolgere un ruolo importante anche nella regolazione della cyt-

G6PDH, tale regolazione sembra essere dovuta dalla presenza di diversi elementi SURE nel promotore del gene della cyt-G6PDH (Hauschild e von Schaewen, 2003), suggerendo una regolazione di tipo "sugar-sensing" per questa isoforma, a differenza delle G6PDH plastidiali (Hauschild e von Schaewen, 2003).

Per verificare questa ipotesi, sono stati approntati esperimenti per accertare la sensibilità verso gli zuccheri dell'isoforma cyt-G6PDH in piante di orzo cresciute in idrocoltura.

I risultati indicano che l'attività cyt-G6PDH aumenta sia nelle radici che nelle foglie di piante d'orzo cresciute in presenza di 50 mM fruttosio. Nelle radici si riscontra una risposta più rapida (entro le 12 h) rispetto alle foglie (dopo 24h); questo effetto è certamente dovuto al ruolo che le radici hanno nell'assorbimento dei nutrienti dal terreno liquido (in cui il fruttosio è presente). In entrambi i tessuti l'incremento dell'attività perdura almeno per 3 giorni, suggerendo una stabile attivazione dell'isoforma citosolica G6PDH da parte degli zuccheri.

4.2 Conclusioni e riepilogo

Gli obiettivi proposti in questo progetto di ricerca sono stati quindi raggiunti:

La sequenza codificante l'isoforma citosolica della G6PDH in orzo è stata ottenuta.

Le analisi bioinformatiche sulla sequenza amminoacidica hanno messo in evidenza i domini conservati e funzionali che la caratterizzano ed indicano la probabile presenza di più isoforme citosoliche in orzo.

L'analisi filogenetica ha dato importanti informazioni circa l'evoluzione di questo gene negli organismi fotosintetici.

L'ottenimento di una proteina cyt-G6PDH ricombinante ad elevata stabilità ha permesso la caratterizzazione e lo studio dei principali parametri cinetici.

Le variazioni dell'attività G6PDH in piante d'orzo cresciute in presenza di fruttosio ha confermato che tale proteina è regolata dai livelli di zuccheri presenti nella cellula secondo un probabile meccanismo sugar-sensing.

Infine la valutazione dei livelli di trascritti in piante d'orzo infettate con il patogeno *Blumeria graminis* ha evidenziato il coinvolgimento di tale enzima nei meccanismi di difesa della pianta, suggerendo un coinvolgimento sia nella risposta aspecifica, che si genera sia in piante resistenti che suscettibili in presenza di patogeni; sia nella risposta specifica tipica delle sole piante resistenti al fine di evitare il propagarsi dell'infezione.

CAPITOLO 5

Bibliografia

- **Anderson LE, Lim TC, Yoon Park KE.** (1974) Inactivation of pea leaf chloroplastic and cytoplasmic glucose 6 phosphate dehydrogenase by light and dithiothreitol. *Plant Physiology* **53**, 835-839.
- **Anderson BM, Wise BJ and Anderson CD.** (1997) Azotobacter vinelandii glucose-6-phosphate dehydrogenase properties of NAD- and NADP-linked reactions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1340**, 268-276.
- **Batz O, Logemann E, Reinold S, Hahlbrock K.**(1998). Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biological chemistry* **379**, 1127–1135
- **Buchanan B.B and Balmer Y.** (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology* **56**,187-220,
- **Bieri S, Mauch S, Shen QH, Peart J, Devoto A, Casais C, Ceron F, Schulze S, Steinbiss HH, Shirasu K, Schulze-Lefert P.** (2004) RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance. *Plant Cell* **16**, 3480.
- **Bowsher CG, Hucklesby DP, Emes MJ.** (1989) Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in plastids purified from roots of *Pisum sativum*. *Planta* **177**, 359-366.
- **Bowsher CG, Boulton EL, Rose J, Nayagam S, Emes MJ.** (1992) Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *The Plant Journal* **2**, 893-898.

- **Bredemeijer GMM, Esselink G.** (1995) Glucose 6-phosphate dehydrogenase during cold-hardening in *Lolium perenne*. *Journal of Plant Physiology* **145**, 565-569.
- **Caldo RA, Nettleton D and Wise RP.** (2004). Interaction-dependent gene expression in Mla-specified response to barley powdery mildew. *Plant Cell* **16**, 2514-2528.
- **Cattivelli L, Baldi P, Crosatti C, Di Fonzo N, Faccioli P, Grossi M, Mastrangelo AM, Pecchioni N, Stanca AM.** (2002) Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant Molecular Biology* **48**, 649–665.
- **Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sanderman H Jr., Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W.** (1998) Defence activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences - USA*, **95**, 5818-5823.
- **Cosgrove, MS, Naylor C, Paludan S, Adams MJ, and Levy HR.** (1998) On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **37**, 2759-2767.
- **Debnam PM, Emes MJ.** (1999) Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1653-1661.
- **Dixon RA, Harrison MJ.** (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 479-501.
- **Ellingboe AH.** (2001) Plant-pathogen interactions: genetic and comparative analyses. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 79-84.
- **Eicks M, Maurino V, Knappe S, Flugge UI, Fischer K.**(2002). The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate

pathways in plants. *Plant Physiology* **128**, 512–522.

- **Emes MJ, Fowler MW.** (1983) The supply of reducing power for nitrite reduction in plastids of seedling pea roots (*Pisum sativum* L.). *Planta* **158**, 97-102
- **Esposito S, Carfagna S, Massaro G, Vona V, Di Martino Rigano V.** (2001a) Glucose-6P dehydrogenase in barley roots: kinetic properties and localisation of the isoforms. *Planta* **212**, 627-634.
- **Esposito S, Massaro G, Vona V, Di Martino Rigano V, Carfagna S, Rigano C.** (2001b) Ammonium induction of a novel isoform of glucose-6Pdehydrogenase in barley roots. *Physiologia Plantarum* **113**, 469-476.
- **Esposito S, Massaro G, Vona V, Di Martino Rigano V, Carfagna S.** (2003) Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta* **216**, 639-647.
- **Esposito S, Guerriero G, Vona V, Di Martino Rigano V, Carfagna S, Rigano C.** (2005) Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: the dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. *Journal of Experimental Botany* **56**, 55-64.
- **Esposito S, Guerriero G, Vona V, Di Martino Rigano V, Carfagna S, Rigano C.** (2006) Glucose-6P dehydrogenase in *Chlorella sorokiniana* (211/8k): an enzyme with unusual characteristics. *Planta* **223**, 796-804.
- **Fickenscher K, Scheibe R.** (1986) Purification and properties of the cytoplasmatic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. *Archivives of Biochemistry and Biophysics* **247**, 393-402.
- **Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** (2006) Crosstalk between

abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 436–442.

- **Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N. and Jacquot JP.** (2005) The plant thioredoxin system. *Cell Molecular and Life Sciences* **62**, 24-35.
- **Giménez MJ, Pistòn F, Atienza SG.** (2011) Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the *Triticeae*. *Planta* **233**, 163-73.
- **Graeve K, von Schaewen A, Scheibe R.** (1994) Purification, characterisation, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Journal* **5**, 353-361.
- **Hammond-Kosack KE. and Jones JDG.** (1997). Plant Disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 573-607.
- **Hancock JT, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Neill SJ** (2002) Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 611-617.
- **Hauschild R, von Schaewen A.** (2003) Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiology* **133**, 47-62.
- **Herrmann KM and Weaver LM.** (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 473-503.
- **Hong ZQ, Copeland L.** (1991) Isoenzymes of glucose 6-phosphate dehydrogenase from the plant fraction of soybean nodules. *Plant Physiology* **96**, 862-867.
- **Hou FY, Hueng J, Lu JF, Wang ZF, Zhang HS.** (2006)

Isolation and expression analysis of plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase gene from rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genetica Sinica* **33**, 441-448.

- **Huang J, Wang JF, Zhang HS, Cao YJ, Lin CF, Wang D, Yang JS.** (2002) In silico cloning of glucose-6-phosphate dehydrogenase cDNA from rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genetica Sinica* **29**, 1012-1016.
- **Huppe HC, Turpin DH.** (1994) Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 577-607.
- **Hutcheson SW.** (1998). Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 59-90.
- **Hutchings D, Rawsthorne S, Emes MJ.** (2005) Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oil seed rape (*Brassica napus*). *Journal of Experimental Botany* **56**, 577-585.
- **Knight JS, Emes MJ, Debnam PM.** (2001) Isolation and characterisation of a full-length genomic clone encoding a plastidial glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum*. *Planta* **212**, 499-507.
- **Kruger NJ, von Schaewen A.** (2003) The pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 236-246.
- **Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R and Coruzzi GM.** (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 569-593.
- **Lea PJ; Mifflin BJ.** (2003) Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 555-564.
- **Lendzian K, Bassham JA.** (1975) Regulation of glucose-6-

phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1,5-diphosphate and NADPH/NADP⁺ ratios. *Biochimica et Biophysica Acta* **396**, 260-275.

- **Lendzian KJ.** (1980) Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADPH, NADP⁺ and dithiothreitol at variable NADPH/NADP⁺ ratios in an illuminated reconstituted spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplast system. *Planta* **148**, 1-6.
- **Levine A.** (1999) Oxidative stress as a regulator of environmental responses in plants. In: *Plant responses to environmental stresses. From phytohormones to genome reorganization*. Ed. HR Lerner. The Hebrew University of Jerusalem Givat Ram, Jerusalem, Israel. 247-264.
- **Lusso M and Kuc J.** (1999) Plant responses to pathogens. In: Lerner H (ed) *Plant Responses to Environmental Stresses from Phytohormones to Genome Reorganization* (pp 683–706) Marcel Dekker, NY.
- **Martin W and Herrmann RG.** (1998) Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *Plant Physiology* **118**, 9-17.
- **Maurino V, Knappe S, Flugge UI, Fischer K.** (2002) The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiology* **128**, 512–522.
- **Mur LAJ, Brown IR, Darby RM, Bestwick CS, Bi YM, Mansfield JW, Draper J.** (2000) A loss of resistance to avirulent bacterial pathogens in tobacco is associated with the attenuation of a salicylic acid-potentiated oxidative burst. *Plant Journal* **23**, 609–621.
- **Née G, Zaffagnini M, Trost P, Issakidis-Bourguet E.** (2009) Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin. *FEBS Letters* **17**, 2827-2832.

- **Nemoto Y, Sasakuma T.** (2000) Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* **158**, 53-60.
- **Nemoto Y, Sasakuma T.** (2002) Differential stress responses of early salt-stress responding genes in common wheat. *Phytochemistry* **61**, 129–133.
- **Nishimura M, Beevers H.** (1981) Isoenzymes of sugar phosphate metabolism in endosperm of germinating castor beans. *Plant Physiology* **67**, 1255-1258.
- **Orita I, Sato T, Yurimoto H, Kato N, Atomi H, Imanaka T, Sakai Y.** (2006) The Ribulose Monophosphate Pathway Substitutes for the Missing Pentose Phosphate Pathway in the Archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of Bacteriology* **188**, 4698–4704 .
- **Oji Y, Watanabe M, Okamoto S.** (1985) Nitrite reduction in barley-root plastids: dependence on NADPH coupled with glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases, and possible involvement of an electroncarrier and a diaphorase. *Planta* **165**, 85-90.
- **Paolacci A, Tanzarella O, Porceddu E, Ciaffi M.** (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology* **10**, 11 doi:10.1186/1471-2199-10-11.
- **Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, Guern J.** (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* **9**, 2077–209.
- **Rolland F, Moore B, and Sheen J.** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* **14 (suppl.)**, 185–205.

- **Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J.** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**,675–709.
- **Seeholzer S, Tsuchimatsu T, Jordan T., Bieri S., Pajonk S., Yang W, Jahoor A, Shimizu KK, Keller B and Schulze-Lefert P.** (2010) Diversity at the Mla powdery mildew resistance locus from cultivated barley reveals sites of positive selection. *Molecular Plant Microbe Interactions* **23**, 497–509.
- **Schaeffer F and Stanier RY.** (1978) Glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Anabaena* sp.: Kinetic and molecular properties. *Archives of Microbiology* **116**, 9-19.
- **Scharte J, Scho H, Weis E.** (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell, and Environment* **28**,1421–1435.
- **Scharte J, Schön H, Tjaden Z, Weis E, von Schaewen A.** (2009) Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences - USA* **106**, 8061-8066.
- **Scheibe R, Geissler A, Fickenscher K.** (1989) Chloroplast glucose-6-phosphate dehydrogenase: Km shift upon light modulation and reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **274**, 290-297.
- **Scheibe R.** (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum* **120**, 21–26.
- **Scheideler M, Schlaich NL, Fellenberg K, Beissbarth T, Hauser NC, Vingron M, Slusarenko AJ and Hoheisel JD.** (2002) Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 10555–10561.
- **Schnarrenberger C, Oeser A, Tolbert NE.** (1973) Two

isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **154**, 438-448.

- **Schnarrenberger C, Fletchener A, Martin W.** (1995) Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant Physiology* **108**, 609-614.
- **Schurmann P and Jacquot JP.** (2000). Plant thioredoxin systems revisited. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 371-400.
- **Shannon A, Gover S, Lam V, Adams MJ.** (2000) Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NAD⁺ molecule and provides insight into enzyme deficiency. *Structure* **8**, 293-303.
- **Sharma KK, Lavanya M.** (2002) Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. *JIRCAS Working Report*, 61-73.
- **Sharp RE.** (2002) Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress *Plant, Cell, and Environment* **25**, 211–222.
- **Sindelar L, Sindelarova M, Burketova L.** (1999) Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissue and protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 195-201.
- **Sindelar L, Sindelarova M.** (2002) Changes in the G6PDH / 6PGDH ratio and glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate and fructose-6-phosphate contents in the tobacco plant infected with potato virus Y. *Biologia Plantarum* **45**, 575-580.
- **Toyoda K, Collins NC, Takahashi A, Shirasu K.** (2002) Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. *Transgenic Research* **11**, 567-582.

- **Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gomez-Rodriguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernandez-Ocana A, Del rio LA and Barroso JB.** (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell, and Environment* **29**, 1449-1459.
- **von Schaewen A, Langenkamper G, Graeve K, Wenderoth I, Scheibe R.** (1995). Molecular characterisation of the plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato in comparison to its cytosolic counterpart. *Plant Physiology* **109**, 1327-1335.
- **Wakao S, Benning C.** (2005). Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **41**, 243-256.
- **Wakao S, Andre C, Benning C.** (2008) Functional analyses of cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenases and their contribution to seed oil accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 277-288.
- **Wang X, Ma, Y, Huang C, Wan Q, Li N, Bi Y.** (2008) Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a central role in modulating reduced glutathione levels in reed callus under salt stress. *Planta* **227**, 611-623.
- **Wenderoth I, Scheibe R, von Schaewen A.** (1997) Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biology Chemistry* **272**, 26985-26990.
- **Wendt UK, Hauschild R, Lange C, Pietersma M, Wenderoth I, von Schaewen A.** (1999) Evidence for functional convergence of redox regulation in G6PDH isoforms of cyanobacteria and higher plants. *Plant Molecular Biology* **40**, 487-494.
- **Wendt UK, Wenderoth I, Tegeler A, von Schaewen A.** (2000) Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.).

Plant Journal **23**, 723-733.

- **Wilma M. Frederiks WM, Sindelarova HV.** (2001) Localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity on ribosomes of granular endoplasmic reticulum, in peroxisomes and peripheral cytoplasm of rat liver parenchymal cells . *The Histochemical Journal* **33**, 345–353.

CAPITOLO 6

Abbreviazioni

ABA: Acido abscissico

AMP: Ampicillina

AVR: Geni di virulenza

ATP: Adenosina trifosfato

BCIP, 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

Bgh: Blumeria graminis sp. hordeii

Cys: Cisteina

Ct: Ciclo soglia

DTT: Ditiotretolo

EDTA: Etilendiamminotetracetico

Et: Etilene

E4P: Eritrosio 4-fosfato

F6P: Fruttosio 6-fosfate

Fd: Ferrodossina

FTR: Ferrodossina-tioreddossina reductasi

G3P: Gliceraldeide 3-fosfato

G6P: Glucosio 6-fosfato

G6PDH: Glucosio 6-fosfato deidrogenasi

GPT: Trasportatore del glucosio-6-fosfato

GAPDH: Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi

GSH: Glutatione Ridotto

Gln: Glutamina

GS: Glutamina sintetasi

GOGAT: Glutamine oxoglutarate aminotransferasi (Glutammato sintasi)

GDH: Glutammato deidrogenasi

HR: Risposta ipersensibile

JA: Acido Jasmonico

Km: Costante di Michaelis-Menten

Ki: Costante d'inibizione

IPTG: Isopropil-beta-D-tiogalactopiranoside

LAR: Resistenza localizzata acquisita

NBT, Nitro blu di tetrazolio

NADP⁺ : Nicotinamide adenina dinucleotide fosfato, ossidato

NADH: Nicotinamide adenina dinucleotide fosfato, ridotto

NAD⁺: Nicotinamide adenina dinucleotide, ossidato

Nir: Nitrito reduttasi

NR: Nitrato reduttasi

OPPP: Ciclo dei pentosi fosfato

PCD: Morte cellulare programmata

Pi: fosfato inorganico

PEP: Fosfoenolpiruvato

PPT: trasportatore fosfoenolpiruvato/fosfato

PSI: Fotosistema uno

PAGE: Elettroforesi su gel di poliacrilammide

R: Geni resistenza

Ri5P: Ribosio-5-fosfato

ROS: Specie reattive dell'ossigeno

Ru5P: Ribulosio 5-fosfato

SA: Acido Salicilico

SAR: Resistenza acquisita sistemica

SURE: Elementi di risposta agli zuccheri

Trx: Tiorredossina

UA: Unità di assorbanza

Xlu5P: Xilulosio-5-fosfato

XPT: Trasportatore dello xilulosio-5-fosfato

6PGDH: 6-fosfogluconato deidrogenasi

Appendice:

Barley Cultivars		scored infection phenotypes		Reference
Name	Identifier	A6	K1	
Iso 1R Manchuria isogenic (Algerian, <i>Mla1</i>)	CIho 16137	v	i	ZHOU <i>et al.</i> 2001
Ingrid isogenic (Black Russian, <i>Mla2</i>)	IGV 3-002	iv	iii	this work
Ingrid isogenic (Ricardo, <i>Mla3</i>)	IGV 3-003	ii	ii	this work
Gopal	PI 41162	iii	iii	this work
Iso 20R Manchuria isogenic (Franger, <i>Mla6</i>)	CIho 16151	i	v	HALTERMAN <i>et al.</i> 2001
Iso 10R Manchuria isogenic (Multan, <i>Mla7</i>)	CIho 16147	iii	iv	HALTERMAN and WISE 2004
Golden Promise	PI 467829	v	v	this work
Ingrid isogenic (Akka, <i>Mla9</i>)	IGV 3-009	ii	v	this work
Iso 12R Manchuria isogenic (Durani, <i>Mla10</i>)	CIho 16149	i	v	HALTERMAN and WISE 2004
Ingrid isogenic (A222, <i>Mla11</i>)	IGV 3-011	v	v	this work
Ingrid isogenic (Emir, <i>Mla12</i>)	IGV 3-012	ii	v	SHEN <i>et al.</i> 2003
Manchuria isogenic (Rupree, <i>Mla13</i>)	CIho 16155	i	i	HALTERMAN <i>et al.</i> 2003
Ingrid isogenic (Franger, <i>Mla14</i>) ^a	IGV 3-015	i	v	this work
Long Glumes ^b	CIho 6168	ii	v	this work
Diamant x 1B-54B ^c		i	i	this work
RS 170-47 ^c		ii	i	this work
RS20-1 x Kiebitz B ^c		i	i	this work
RS20-1 x Kiebitz B ^c		i	i	this work
Diamant x 1B-86B ^c		i	i	this work
RS145-39 x Kiebitz ^c		i	i	this work
Ingrid isogenic (Hordeum 1657, <i>Mla22</i>)	IGV 3-067	v	i	this work
Ingrid isogenic (Hordeum 1402, <i>Mla23</i>)	IGV 3-066	iii	iii	this work
Engledow India ^d	CIho 7555	i	i	this work
RS170-10 x Piccolo A ^e		ii	ii	this work
Diamant x 1B-20 ^e		ii	i	this work
RS1-8 x Piccolo E ^e		ii	i	this work
RS1-8 x Piccolo E ^e		ii	i	this work
Diamant x 1B-151 ^e		i	i	this work
110-4 x Sonja ^f		iv	ii	this work
Nigrate	HOR 14775	iii	v	this work
Turkey 290	CIho 13646	v	v	this work
142-29 x Dura ^f		i	i	this work
RS70-29 ^g		i	i	this work
Sv. 57/510-44	CIho 14013	i	i	this work
Arlington Awnless	CIho 702	iii	v	this work
Kairyobozu-nmgi	CIho 11556	v	i	this work
Nepal	PI 12709	iv	iv	this work
Nigri Nudum	CIho 11549	iv	iv	this work
Nakaizumi-Zairai	CIho 11561	iv	iii	this work
Vogelsanger Gold	PI 406266	i	iv	this work
Atlas	ChI 13824	v	iv	this work
Magnif 105	PI 337142	iii	iv	this work
52	PI 134257	v	v	this work
Marco	PI 94877	iv	v	this work
Russian 81	CIho 11546	iv	ii	this work

Tabella 6.1. Tabella di riferimento per la scelta delle linee di piante e dell’isolato fungino di *Blumeria graminis* da utilizzare durante gli esperimenti di infezione.

Didascalia: Classificazione del fenotipo di infezione: (i) completa immunità senza visibile crescita fungina; (ii) crescita fungina è appena rilevabile; (iii) occasionale crescita fungina; (iv) ampia crescita di funghi con poche macchie necrotiche; (v) abbondante crescita fungina.

K1 (AvrMla1, AvrMla3, AvrMla7, AvrMla13, and AvrMla22); A6 (AvrMla3, AvrMla6, AvrMla7, AvrMla9, AvrMla10, AvrMla12, and AvrMla13) (Bieri et al., 2004). (Seeholzer et al.,2010).

Combinazioni di primers utilizzate per l’isolamento della
sequenza cyt-G6PDH in orzo

<i>primers</i>	<i>lunghezza amplificato attesa</i>
CYT FOR3+CYT REV	505 bp
CYT FOR1+ CYT REV	469 bp
CYT FOR3+ CYT REV3	365 bp
CYT FOR1+ CYT REV3	329 bp
CYT FOR2+ CYT REV	220 bp
CYT FOR2+ CYT REV3	80 bp

Tabella 6.2: Descrizione dei Primers disegnati sulla base di regioni conservate cyt-G6PDH individuate in seguito ad allineamento multiplo fra sequenze G6PDH citosoliche note.

Amplificazione su cDNA di radici di orzo

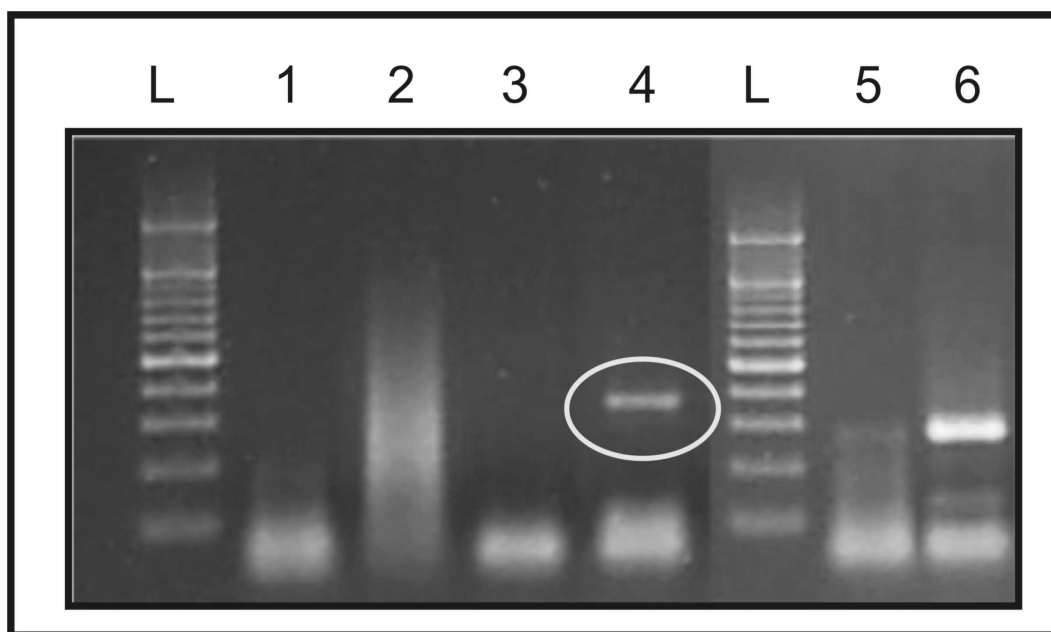


Figura 6.1: Corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 1.5%. Il cDNA di radici di orzo era amplificato per l'isolamento della sequenza citosolica della G6PDH con coppie di primers degenerati.

Leggenda: L marcatore molecolare (*ladder 100*); Prodotto di amplificazione ottenuto con la coppia di primer: For3-Rev→ 1; For1-Rev→ 2; For3-Rev3→ 3; For1-Rev3→ 4; For2-Rev→ 5; For2-Rev3→ 6. Il cerchio evidenzia la banda attesa (329 bp).

Allineamento G6PDH note

	10	20	30	40
			
Hvcyt	-----			
TaCy	-----			
OsCy	-----			
NtCy	-----			
Ptcyt	-----			
Atcyt1	-----			
Atcyt2	-----			
Mtcyt	-----			
Ppcyt	-----			
Cvcyt	-----			
Mpcyt	-----			
Dmcyt	-----			
Hscyt.	-----			
Bdcyt	-----			
Sccyt	-----			
PpP2	-----			
PpP1	-----			
HvP2	-MALSCMRCPSVAAGPAVRR----	PSSSVA-----L		
OsP2	-MALSCMRCSPAAG--AVRRGLASAAPPAA-----L			
MtP2	MATLYSTHCRSFP---SSSFPSSSLSSN---QSAVTFS			
PtP2	MATLYSTTCRSISYSLTPSSSSSSSLRINGQNHQRLNFS			
NtP2	MVTLYSSPSTHSSG--AVASYSNSSIGLYNYHHNKQIAVS			
AtP2	MAALSSSVTTRSYH-----SGYLASFSPVNGDRHRSLSFL			
NtP1	MGGQLQLNPCSSSSVATTTFHNGAHKFCRNF-----			
PtP1	--MATHFSPCSSS--STNFLP--SSCFKNE-----			
SoP1	---MEELVSCHHLP---LLCLQSSVPPNG-----			
AtP1	MATHSMIIPSPSSS---SSSLATAASPFK-----			
OsP1	-MAGTGLRFRQGAI---FFSGAHAAAHPR-----			
Cv	-----			
Db	MLGGRQLGMDKLSRKLSGAQPVANYSRRP-----			
Mp	MAAAAASLGASRAY-----A			
Gs	MWIPLFITGFWNTNTSSSHLWKTKYTKGWTTPLYFSKVDK			
Pt	-----			
Ec cyt	-----			
Ec cyt.	-----			
Acyt	-----			
Clustal Consensus				
	50	60	70	80
			
Hvcyt	-----	MAGTDSSASSRQSS-		
TaCy	-----	MAGTDSSASSRQSS-		
OsCy	-----	MSG-GSSPRSRSS-		
NtCy	-----	MAAS-WCIEKRGLR		
Ptcyt	-----	MMSGQWMVEKRSSF		
Atcyt1	-----	MMSGQWHMEKRSTLK		
Atcyt2	-----	MMSGQWHVEKRSTFR		
Mtcyt	-----	MGTNEWHVERRDSIG		
Ppcyt	-----	MGATAQKDAPPTVEAVAPALSEDTSER		
Cvcyt	-----	MAVLTD DRKASQLLE		
Mpcyt	-----	MLPPKRQHTRWED		
Dmcyt	-----	MATQKEDHTALDLI		
Hscyt.	-----	MAEQ---VALSRT		
Bdcyt	-----			
Sccyt	-----	MSEGPVK		
PpP2	--MAQRKNTSYKMY-----YILN-----			
PpP1	--MQTGGKEAETAR-----LATNDGSAQSASPV			
HvP2	SLARCGGRPAAVASGGWRIHAVAGKGVVKGPMDTAVENTV			

OsP2	SFARCGLRRAAALG--WRVAAVATTG-VQGAKDAGLEKAA
MtP2	----NRFLAATVSLKSQHNLLQQVSVHTQQHDGTVGANVT
PtP2	SCIAKRVLPVKVSFHSRRNFHLNV---VLMQDGAVATPVT
NtP2	SILSRKFGSLQINQKPFWN-----AVRMQDGAVATPPS
AtP2	SASPQGLNPLDLCVRFQRKSGRAS---VFMQDGAIVTNSN
NtP1	NILPFKAHSLESSVASTFHNGI-YSRIQPRKHFEIMSSNG
PtP1	TTVLFSRFAVTVPRKSTWVTQN-HSRIQGRKHFHIKSSNG
SoP1	CLTFFQDSACQRCSEFSNGHPLNDVSLQNDVAVNPIVA
AtP1	ETLPLFSRSLTFPRKSLFSQVR--LRFFAEKHSQLDTSNG
OsP1	TRTPHHHCSPQORTHDARGRCRLTAKSANGRPQISAS-FRD
Cv	-----
Db	SRPFRAAPVPRVAQNSQDAVTQNGSGTSEAPTQNPALK
Mp	TPVARGAAIRSRTRAARKIIPGRRSANGLRVDAVAADAPS
Gs	SFFAPRLASIQAVQGDLNIA PQWNDSSLETTLPITTNER
Pt	-----MIICSL
Eccyt	-----
Eccyt.	-----
Acyt	-----MVSLLE
Clustal Consensus	
	90100110120

Hvcyt	FNSLAKDLELPLEQG-----CL
TaCy	FNSLAKDLELPLEQG-----CL
OsCy	FNSLSRDLELPSEQG-----CL
NtCy	LDSF-RENDNIPETG-----CL
Ptcyt	SDSFSKEYETVPETG-----CL
Atcyt1	NDSFVKEYNPVTETG-----SL
Atcyt2	NDSFVREYGIVPETG-----CL
Mtcyt	TESP--VAREVLETG-----TL
Ppcyt	TNSDQPIKEKSVAGG-----CL
Cvcyt	SEPSFPSTRDCWHCGFE-----RDLCL
Mpcyt	PK-----VCL
Dmcyt	IKSLKSPTMVCEGTHFD-----GKIPH
Hscyt.	QVCGILREELFQGDAFH-----QSDTH
Bdcyt	MSSPVSPTLNDN-----C
Sc cyt	FEKN-----T
PpP2	RLKDG YLYNSGSN-----LTTV
PpP1	SAKDESRVAGSQNG-----VAVATETTV
HvP2	APAAPSPVENG TSSAIT-----VEEYEDLASLAKDDEASV
OsP2	RSASQSKVENGSPSEII-----LDDFEDLSPLSENDDSTV
MtP2	PVENNHSGKRLRPELLS-VLSSMESKVEDGAEKDENE CTV
PtP2	PVENETPFKKLKDGLSSVPSTEEIKEAASFV NKDESTV
NtP2	KIENETPLKKLKN GILP-VAPPKEQKDTIDFDSNKAKSTV
AtP2	SSESKTSLKGLKDEVLS-ALSQEAAKVGVESD-GQSQSTV
NtP1	FHLNAVSLLDGSASKSM-----PEQVPLTELENAETTV
PtP1	HPLNAVSLQDG-----QKAEKEESTL
SoP1	KSIDPSADLQLLP-----LLESVKEEPTL
AtP1	CATNFASLQDSGD-----QLTEEHVTKGESTL
OsP1	VAIDGAQSEDGAP-----EQGGSTV
Cv	-----MRVYGLQ-----EENWDQSAL
Db	KAIPTVVSLSD EAAAMA-----ADDWSQSSL
Mp	AIDDDAAMFKGKVK-----KSGKL
Gs	PAIPRQHFSHLGDTLDP-----SLMDSVKKRKQRAKEEPL
Pt	TFCFCSVVNDAKES-----V
Eccyt	--MAVTSTAQACD-----
Eccyt.	--MAVTQTAQACD-----
Acyt	NPLRVGLQQQGMPEPQI-----
Clustal Consensus	
	130140150160

Hvcyt	TIVVLGASGDLAKKKTFFPALYHLFEQGF LQSGEVHIVGYA
TaCy	TIVVLGASGDLAKKKTFFPALYHLFEQGF LQSGEVHIVGYA

OsCy	SVIVLGASGDLAKKKTFPALFHLFAQGFIQSGEVHIFGYA
NtCy	SIIVLGASGDLAKKKTFPALFNLYRQGFLQSNEVHIFGYA
Ptcyt	SIIVLGASGDLAKKKTFPALYNLYRRGFLQSNEVYIFGYA
Atcyt1	SIIVLGASGDLAKKKTFPALFNLFHQGFLNPDEVHIFGYA
Atcyt2	SIIVLGASGDLAKKKTFPALFNLYRQGFLNPDEVHIFGYA
Mtcyt	SIVVLGASGDLAKKKTFPALFHLYKQELLPPDEVHIFGYA
Ppcyt	SVVVLGASGDLAKKKTFPAIFNLYKQGFLP-DEMHI
Cvcyt	TIVVAGASGDLASKKTYPALQFLHHNGFLP-RKVAII
Mpcyt	TITVLGCSGDLAKKKTYPALFALFTHGHLP-PSTIVL
Dmcyt	TFVIFGASGDLAKKKIYPTLWWLYRDDLLP-KPTKFC
Hscyt.	IFIIMGASGDLAKKKIYPTIWWLFRDGLLP-ENTFIV
Bdcyt	CIVVLGASGDLAFKKTYPALFGLFRNGFLP-HNFQIV
Sccyt	VISVFGASGDLAKKKTFPALFGLFREGYLD-PSTKIF
PpP2	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEGCLP-KHFTIF
PpP1	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEGCLP-KHFTV
HvP2	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEGCLP-KHFSI
OsP2	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEDCLP-KHFTI
MtP2	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEGCLP-KHFTI
PtP2	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEGCLP-EHFTI
NtP2	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEGCLP-EHFTI
AtP2	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEGCLP-EHFTI
NtP1	SITVIGASGDLAKKKIFTALFALFYEDCLP-ENFI
PtP1	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALFYEDWLP-ENFTV
SoP1	SIIVVGASGDLAKKKIFPALFALFYENCLP-ENFTV
AtP1	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALFYEGCLP-QDFS
OsP1	SITVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEDCLP-EHFTV
Cv	SIVVVGASGDLAKKKIFPALFALYYEKMLP-KNFKI
Db	SVVVVGASGDLAKKKIFPALFALFYEGLLP-PDFQL
Mp	SICVFGASGDLAKKKVYPAIFSLFYDGHLP-DDFV
Gs	CIVVIGASGDLAKKKTFPALFSLYYHDLIP-KDFLI
Pt	TILVVGASGDLAKRKTYPALLALYKASLLP-SVTII
Ecctyt	-LVIFGAKGDLARRKLLPSLYQLEKAGHIH-PETRI
Ecctyt.	-LVIFGAKGDLARRKLLPSLYQLEKAGQLN-PDTRI
Acyt	-IVIFGASGDLTWRKLVPALYKLRERRIP-PETTIV
Clustal Consensus	. : *.****: :* .:: * : . * .

	170	180	190	200
			
Hvcyt	RTNLSDDG-LRGRIRAYLKG-----			
TaCy	RTNLSDDG-LRGRIRAYLKG-----			
OsCy	RSNLSDDG-LRERIRGYLKG-----			
NtCy	RTKISDDD-LRSRIRGYLS--K--G-----			
Ptcyt	RTKISDDD-LRNRIRGYFG--KDAS-----			
Atcyt1	RSKITDEE-LRDKIRGYLVDEKNAS-----			
Atcyt2	RTKISDEE-LRDRIRGYLVDEKNA-----			
Mtcyt	RSKISDDE-LRNKLRSYLVPEKGASP-----			
Ppcyt	RSKMTDEE-LREKLRGYLKPDRIDPA-----			
Cvcyt	RTQMSDEQ-LRTKLRPRLKG-----			
Mpcyt	RSKMDDDS-LRSVRDRLKG-----			
Dmcyt	RSMLTVDS-IKEQCLPYMKVQPH-----			
Hscyt.	RSRLTVAD-IRKQSEPFKATPE-----			
Bdcyt	RSDLQLDE-FKLRISSKIKFHNEQ-----			
Sccyt	RSKLSMEEDLKSRLVPHLKKPHG-----			
PpP2	RSKMTDES-LREMISGTLTCRIDQS-----			
PpP1	RSKMNDDES-LREMISGTLTCRIDQR-----			
HvP2	RSKMTDAE-LRHMVSKTLTCRIDKR-----			
OsP2	RSKMTDAE-LRNMVSKTLTCRIDKR-----			
MtP2	RSKMTDAE-LRNMVSKTLTCRIDKRLSNIGHGGTVADISD			
PtP2	RSKMTDAE-LRNMVSKTLTCRIDKR-----			
NtP2	RSKMTDAE-LRNMVSKTLTCRIDKR-----			
AtP2	RSKMTDVE-LRNMVSKTLTCRIDKR-----			
NtP1	RTKMSDEE-LRNMISKTLTCRIDQR-----			
PtP1	RTKLTDEE-LRNMISGTLTCRIDQR-----			
SoP1	RTEMNDEE-LRTMISKTLTCRIDQR-----			

Mpcyt	FLGACFYEAGQ-YDDASATGPVFGGLASRLRDFERERCGD
Dmcyt	FWALNEYVSGR-YDGRTG----FELLNQOLEIME--NKNK
Hscyt.	FFARNSYVAGQ-YDDAAS----YQRLNSHMNALH--LGSQ
Bdcyt	FFEKCFYVSGK-YDQDDS----YKKLCTFVEKVEGVIPGK
Sccyt	FFKMVSYISGN-YDTDEG----FDELRTQIEKFEKSANVD
PpP2	FLKRCFYHAGQ-YSSEES----FGQLSDKLRKQEGS----
PpP1	FLKRCFYHSGQ-YSSEES----FGELSKKLHEHEGD----
HvP2	FLKRCFYHSGQ-YDSEED----FRELGKKIELHQGP----
OsP2	FLKRCFYHSGQ-YDSEEH----FMDLDKCLKQHEGS----
MtP2	FLKRCFYHSGQ-YDSPEN----FAALDKKLNEHEGG----
PtP2	FLKRCFYHSGQ-YGSQEN----FAELDKKLKEHEGA----
NtP2	FLERCFYHSGQ-YDSLEN----FAELDKKLKEHEAG----
AtP2	FLKRCFYHSGQ-YDSQEH----FTELDKKLKEHEAG----
NtP1	FLERCFYHSGQ-YHSEDD----FAELDYKLKAKEGS----
PtP1	FLKRCFYHAGQ-YDSEGD----FSELNSKLKEKEAG----
SoP1	FLQRCFYHSGQ-YNSEDD----FSGLDCKLKEKEAG----
AtP1	FLKRCFYHSGQ-YNSEED----FAELNKKLKEKEAG----
OsP1	FLKRCFYQSGQ-YNSEEG----FSELDRLKEKEAG----
Cv	FLDRCFYQAGQ-YASDAD----FAALASRMAEGEAP----
Db	FLSRCFYCPGQ-YDAPEG----YANLDKKCKEQEALTG--
Mp	FLTRCFYTAGQ-YDDPED----YKSLDVAMAEQEALWG-
Gs	FLPKCHYMSGM-YDRTED----FVRLDQFLNNFEQSFPN-
Pt	FLSICNYRPGSSYGDWES-----MDSILKASPSR----
Eccyt	LSNRLDFCNLD-VEDTEG----FKRLG---TMLDQQNR--
Eccyt.	LSARLDFCNLD-VNDTAA----FSRLG---AMLDQKNR--
Acyt	FSQGLFYCPGD-IDNPES----YQKLKNLLSELDEKRG--
Clustal Consensus	: : :
	290 300 310 320

Hvcyt	-GSSRRLFYALPPSVYPSVCKMIRTYCMS-PTSRTGWTR
TaCy	-GSSRRLFYALPPSVYPSVCKMIRTYCMS-PTSRAWTR
OsCy	-ESPRRLFYALPPSVYPSVCKMIRTYCMN-PS---GWTR
NtCy	EGSSRRLFYFALPPSVYPSVCRMINKNYCMN-KSDLGGWTR
Ptcyt	EGSSRRLFYALPPSVYPPVCRMIRKCCMN-RSDLGGWTR
Atcyt1	EGSSRRLFYALPPSVYPPVSKMIKAWCTN-KSDLGGWTR
Atcyt2	EGSSRRLFYALPPSVYPSVCKMIKTCCMN-KSDLGGWTR
Mtcyt	EGSSRRLFYALPPSVYPSVCKMIKTCCMN-KSDLGGWTR
Ppcyt	VSPTRRLFYALPPSVYPLVSKRISKHCMN-QR---GWTR
Cvcyt	-----RLYYLALPPSVYPQVCTGLKTYCDGLPSVEGSWIR
Mpcyt	DGVGHRIFYLALPPSVYPPVCANIKASCA---TTEPAWTR
Dmcyt	AN---RIFYLALPPSVFEEVTVNIKQICMS----VCGWNR
Hscyt.	AN---RLFYLALPPTVYEAVTKNIHESCMS----QIGWNR
Bdcyt	RD---RIFYMALPPSVFSAAAKGLKEHVYT----KDGCMR
Sccyt	VP--HRLFYLALPPSVFLTVAKQIKSRVYA----ENGITR
PpP2	-RVANRLFYLSIPPNIFFVDVARSSSLAASS---ANG-WTR
PpP1	-RVANRLFYLSIPPDVFFVDVARCSSLAASS---ANG-WTR
HvP2	-RVSNHLFYLSIPPNIFFLDVVKCASKSASS---ASG-WTR
OsP2	-RVSNRLFYLSIPPNIFFLDVVKCASKSASS---GNG-WTR
MtP2	-RTSNRLFYLSIPPNIFFDAVKCASLSASS---GNGGWTR
PtP2	-RVSNRLFYLSIPPNIFFIEAVKCASSSASS---GIG-WTR
NtP2	-RFSNRLFYLSIPPNIFFINAVRCASLSASS---AHG-WTR
AtP2	-RISNRLFYLSIPPNIFFDAVKCASTSASS---VNG-WTR
NtP1	-RVSNRLFYLSIPPNIFFDVVRCASLKASS---TSG-WTR
PtP1	-KVSNRLFYLSIPPNIFFDVVRSASLRASS---LNG-WTR
SoP1	-RLQNRLFYLSIPPNIFFDVVRCVSHRASS---ASG-WTR
AtP1	-KISNRLYYLSIPPNIFFDVVRCASLRASS---ENG-WTR
OsP1	-KVPNRLFYLSIPPNIFFDVVRSASRTASS---QDG-WTR
Cv	LECADRLFYLSIPPNIFFTAVAASASKAASS---KCG-WTR
Db	KMVANRMFFLSIPPNVFVQAAGGAADNCSS---PTG-WTR
Mp	DKKTLRLFYLSIPPSIFVPVAQNAARHVSS---KSG-ETR
Gs	-TRVDRLYYLAVPSQVFENVVHHVHESGRT----QRGWNR
Pt	----NLVVYLATPPNVFAQSAAVLKKTLTL--TPTNGFVR
Eccyt	-TTIN---YFAMPPSTFGAICRGLGQAGLN---KEP--AR

Eccyt .	-ITIN---YFAMPPSTFGAICKGLGEAKLN---AKP--AR
Acyt	-TRGNRMFYLSVAPNFFPEAIKQLGGAGML---DDPYKHR
Clustal Consensus	::: .. :
	330 340 350 360

Hvcyt	VIVEKPFGRDLDSAEELSSQLG-ELFQEDQLYRIDHYLGK
TaCy	VIVEKPFGRDLDSAEELSSQLG-ELFEEDQLYRIDHYLGK
OsCy	VIVEKPFGKDLDSSSEELSAQLG-ELFDENQLYRIDHYLGK
NtCy	IVVEKPFGKDLASAEQLSSQIG-ELFNEPQIYRIDHYLGK
Ptcyt	IVIEKPFGKDLESAEKLSAQIG-ELFEEPQLYRIDHYLGK
Atcyt1	IVVEKPFGKDLESAEQLSSQIG-ALFEEPQIYRIDHYLGK
Atcyt2	IVVEKPFGKDLESAEQLSSQIG-ELFDESQIYRIDHYLGK
Mtcyt	VVVEKPFGRDLESAEELSTQIG-ELFEEPQIYRIDHYLGK
Ppcyt	VIVEKPFGKDLESSEALSSELG-ALFSEDQLYRIDHYLGK
Cvcyt	VVVEKPFGLDLQSSEELAEELG-KLYPESQLYRIDHYLGK
Mpcyt	VIVEKPFGRDLESSEKLSSEIA-TLFHESQLYRIDHYLGK
Dmcyt	VIIIEKPFGRDDASSAGLSDHLA-GLFQEDQLYRIDHYLGK
Hscyt .	IIVEKPFGRDLQSSDRLSNHIS-SLFREDQIYRIDHYLGK
Bdcyt	LIVEKPFGKDSQSSDLVFLA-KYWQEDEIYRIDHYLGK
Sccyt	VIVEKPFGHDLASARELQKNLG-PLFKEEELYRIDHYLGK
PpP2	VIVEKPFGRDSESSAELTRGLK-TYLKEDQIYRIDHYLGK
PpP1	VIVEKPFGRDSESSAELTRGLK-TYLNEDQIYRIDHYLGK
HvP2	VIVEKPFGRDSESSAALTRGLK-EFLAEDQIFRIDHYLGK
OsP2	VIVEKPFGRDSDSSSALTRGLK-QYLVEDQIFRIDHYLGK
MtP2	VIVEKPFGRDSESSAALTRSLK-QYLTEDQIFRIDHYLGK
PtP2	VIVEKPFGRDSDSSAALTKALK-QYLDEDQIFRIDHYLGK
NtP2	VIVEKPFGRDSESSAALTRSLK-QYLNEDQIFRIDHYLGK
AtP2	VIVEKPFGRDSETSAAATKSLK-QYLEEDQIFRIDHYLGK
NtP1	VIVEKPFGRDLESSSELTRCLK-KYLTEEQIFRIDHYLGK
PtP1	VIVEKPFGRDSESSGELTRCLK-QYLTEDQIFRIDHYLGK
SoP1	VIVEKPFGRDSDSSRELTRSFK-QYLSEDQIFRIDHY-GK
AtP1	VIVEKPFGRDSESSGELTRCLK-QYLTEEQIFRIDHYLGK
OsP1	FIVEKPFGRDSESSGELTRNLK-KYLAEEQIFRIDHYLGK
Cv	MIVEKPFGRDSESFICALSDELY-RHLREDQIYRIDHYLGK
Db	VIVEKPFGRDSASSAELGRGLA-RHLTEDQIYRIDHYLGK
Mp	VIVEKPFGRDLESSRALTEALA-QDLAEEHTYRIDHYLGK
Gs	IVMEKPFGKDITSYLQLRNSLR-NCISEDEIYRIDHYLGK
Pt	LVLEKPFGSDTESCETLLRTLNNQEWLEQQLYRIDHYLGK
Eccyt	VVMEKPLGTNLASSRVINNQVA-EFFNECQVYRIDHYLGK
Eccyt .	VVMEKPLGTSLATSQEINDQVG-EYFEECQVYRIDHYLGK
Acyt	LVIEKPFGRDLASAQSLNAVQ-KYCKEHQVYRIDHYLGK
Clustal Consensus	..:****:* . : : . * . :***** **
	370 380 390 400

Hvcyt	ELVQNLLVLRFANRFLPLWNRDNVDNIQIVFREDFGTDG
TaCy	ELVQNLLVLRFANRFLPLWNRDNVDNIQIVFREDFGTDG
OsCy	ELVQNLLVLRFANRFLPLWNRDNIDNIQIVFREDFGTDG
NtCy	ELVQNVLVLRFANRFFLPLWNRDNIDNIQIVFREDFGTEG
Ptcyt	ELVQNLLVLRFANRFFLPLWNRDNIDNVQIVFREDFGTEG
Atcyt1	ELVQNMLVLRFANRFLPLWNRDNIANVQIVFREDFGTEG
Atcyt2	ELVQNMLVLRFANRFFLPLWNRDNIENVQIVFREDFGTEG
Mtcyt	ELVQNMLVLRFANRFFLPLWNHNDIDNVQIVFREDFGTDG
Ppcyt	ELVQNLLVMRFANRFFVPIWNRDNIASVQIVFKEDFGTQG
Cvcyt	EMVQNLFVIRFANMFTAPLWNRNCISNVQITFKEDFGTQG
Mpcyt	ELTQNLVVMRFKNRFLAPLWNRDNIASVQIVFKEPFGTQG
Dmcyt	EMVQKLMTIRFGNKILSSTWNRENIASVLITFKEPFGTQG
Hscyt .	EMVQNLMVLRFANRIFGPIWNRDNIACVILTFKEPFGTEG
Bdcyt	EMVKDLMVLRFANVFFGAVWSRSHIHNQVITFKEPIGTEG
Sccyt	ELVKNLLVLRFGNQFLNASWNRDNIQSVQISFKERFGTEG
PpP2	ELVENLSVLRFNSLVFEPLWSRQYIRNVQLIFSEDFGTEG
PpP1	ELVENLSVLRFNSLVFEPLWSRQYIRNVQFIFSEDFGTEG
HvP2	ELVENLSVLRFNSLVFEPLWSRQYIRNVQLIFSEDFGTEG

OsP2	ELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRQYIRNVQLIFSEDFGTEG
MtP2	ELVENLSVLRFSNLIFEPLWSRQYIRNVQLIFSEDFGTEG
PtP2	ELVENLSVLRFSNLIFEPLWSRQYIRNVQLIFSEDFGTEG
NtP2	ELVENLSVLRFSNLIFEPLWSRQYIRNVQFIFSEDFGTEG
AtP2	ELVENLSVLRFSNLIFEPLWSRQYIRNVQFIFSEDFGTEG
NtP1	ELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQFIFSEDSGTEG
PtP1	ELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRDYIRNVQLIFSEDFGTEG
SoP1	ELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQLIFSEDFGTEG
AtP1	ELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQLIFSEDFGTEG
OsP1	ELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQLIFSEDFGTEG
Cv	ELIENLTVLRFANLVFEPLWSRQYIRNVQVIFSENFGTEG
Db	ELIENLTVLRFSNLVFEPLWSRQYIRNVQVIFSEDFGTEG
Mp	ELIENLTVLRFSNIVFQPLWSRTYIRNVQINFSENFGTEG
Gs	ELVQNLMLVRFANYLFEPLWNRDHIASIQIVFKENFGVEG
Pt	EMVQNILTLRQQNRWLNSLWNKDAVKSVHIICKESFGTDG
Eccyt	ETVLNLLALRFANSLFANNWDNRTIDHVQITVAEEVGIEG
Eccyt.	ETVLNLLALRFANSLFVNNWDNRTIDHVEITVAEEVGIEG
Acyt	ETVQNLLVFRFANAIFFEPLWNRQFVDHVQITVAETVGVED
Clustal Consensus	* .: .:* * *.. : : . * * :.
	410 420 430 440

Hvcyt	RGGYFDQYGIIRDIIQNHLLQVFCLVAMEKPVSLKPEHIR
TaCy	RGGYFDQYGIIRDIIQNHLLQVFCLVAMEKPVSLKPEHIR
OsCy	RGGYFDQYGIIRDIIQNHLLQVFCLVAMEKPVSLKPEHIR
NtCy	RGGYFDEYGIIRDIIQNQLLQVLCVAMEKPVSQKPEHVR
Ptcyt	RGGYFDEYGIIRDIIQNHLLQVLCVAMEKPVSLKPEHIR
Atcyt1	RGGYFDEYGIIRDIIQNHLLQVLCVAMEKPIISLKPEHIR
Atcyt2	RGGYFDEYGIIRDIIQNHLLQVLCVAMEKPIISLKPEHIR
Mtcyt	RGGYFDQYGIIRDIIQNHLLQVLCIAMEKPVSLKPEHIR
Ppcyt	RGGYFDEYGIIRDIIQNHLLIQLCLLAMEKPIISLSPEHIR
Cvcyt	RGGYFDSFGIVRDVIQNHLIQLLAMLAMEKPLSIHPDDL
Mpcyt	RGGYFDEYGIIRDIIQNHLLQLLCLVAMEKPCSLSPEDIR
Dmcyt	RGGYFDEFGIIRDVMQNHLQILSLVAMEKPVSCHPDDIR
Hscyt.	RGGYFDEFGIIRDVMQNHLQMLCLVAMEKPASTNSDDVR
Bdcyt	RGGYFDEFGIIRDIMQNHLQILTIVAMEKPIISLNAEDVR
Sccyt	RGGYFDSIGIIRDVMQNHLQIMTLLTMERPVSFDPESIR
PpP2	RGGYFDNYGIIRDIMQNHLQILALFAMEPPVSLDAEDIR
PpP1	RGGYFDNYGIIRDIMQNHLQILALFAMEPPVSLDAEDIR
HvP2	RGGYFDSYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPISLEAEDIR
OsP2	RGGYFDRYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSLDAEDIR
MtP2	RGGYFDNYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSLDAEDIR
PtP2	RGGYFDNYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSLDAEDIR
NtP2	RGGYFDHYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSLDAEDIR
AtP2	RGGYFDNYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSLDAEDIR
NtP1	RGGYFDNYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSMDAEDIR
PtP1	RGGYFDNYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSLDAEDVR
SoP1	RGGYFDNYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSLDAEDIR
AtP1	RGGYFDQYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSLDAEDIR
OsP1	RGGYFDNYGIIRDIMQNHLQILALFAMETPVSLDAEDIR
Cv	RGGYFDQYGIIVRDVIQNHLQILALFAMEQPASLDAEDIR
Db	RGGYFDRYGIIRDVMQNHLQIVALFAMEPPVSLDGEAIR
Mp	RGGYFDNYGIIVRDVIQNHLQILALFAMEEPASLDAEDIR
Gs	RAGYFDEYGIIRDIMQNHLQVMALLGMEQPVTLHAEDIR
Pt	RGGYFDRYGIIRDIFQNHLQLLTLVAMDMPEKSCATKLR
Eccyt	RWGYFDQAGQMRDMIQNHLQILTMIAMSPPADLSTDRI
Eccyt.	RWGYFDKAGQMRDMIQNHLQILCMIAMSPPSDLSADSIR
Acyt	RAGYYEKAGALRDMLQNHLMLQLYCLTAMEAPNSMDADSIR
Clustal Consensus	* **:: * :***:***:***: : *. * :*
	450 460 470 480

Hvcyt	DEKVKVLQSVNPIKDEEEVVLGQY-----QGY
TaCy	DEKVKVLQSVNPIKDEEEVVLGQY-----QGY

OsCy	DEKVKVLQSVNPIKHDEVVLGQY-----EGY
NtCy	DEKVKVLQSMLPIKDEEVVLEQY-----EGY
Ptcyt	DEKVKVLQSVLPIKDEEVVLGQY-----EGY
Atcyt1	DEKVKVLQSVIPIKDEEVVLGQY-----EGY
Atcyt2	DEKVKVLQSVVPISDDEVVLGQY-----EGY
Mtcyt	DEKVKVLESVLPIRDDEVVLGQY-----EGY
Ppcyt	DEKVKVLECIKPFNDKEVVIGQY-----EGY
Cvcyt	DEKVKVLRICIKPVQPHNVVLGQY-----TA-ADAQPGY
Mpcyt	DEKLKVLRCMEPVSTSDVALGQYGASGD--EA-AANKPGY
Dmcyt	DEKVKVLKSIEALTLDMMVLGQYLGNPQ--GTNDDARTGY
Hscyt.	DEKVKVLKCISEVQANNVVLGQYVGNPD--GE-GEATKGY
Bdcyt	DEKVKVLRAIKPLSINDMILGQYTKSAD--GK----TPGY
Sccyt	DEKVKVLKAVAPIDTDDVLLGQYKGSED--GS----KPAY
PpP2	NEKVKVLRSMRVLDVDNVVVGQYKGHT---RGGVKYPAY
PpP1	NEKVKVLRSMRVLDTDNVVVGQYKGHT---RGGVRYPAY
HvP2	NEKVKVLRSMKPLRLEDVVIGQYKSHT---KGGITYPGY
OsP2	NEKVKVLRSMKPLQLEDVVIGQYKSHT---KGGTTYPGY
MtP2	NEKVKVLRSMRPIKLEDVVLGQYKNHT---RGGVAYPAY
PtP2	NEKVKVLRSMRPLQLEDVVVGQYKNHT---KGGVTYPAY
NtP2	NEKVKVLRSMRPLQLDDVIIGQYKSHT---KGDVTYPGY
AtP2	NEKVKVLRSMRPIRVEDVVIGQYKSHT---KGGVTYPAY
NtP1	NEKVKVLRSMRPLQLEDVVLGQYKGHS---KGGKLYPAY
PtP1	NEKVKVLRSMKPLQLEDVIVGQYKGHS---KSGRSYPAY
SoP1	NEKVKVLRSMKPLKLQDVVVGQYKGHS---KGNKSYSGY
AtP1	SEKVKVLRSMKPLRLEDVVVGQYKGNH---KGGKTYPGY
OsP1	NEKVKVLRSMRQLRLEDVVVGQYKGHS---KGGKTYPAY
Cv	NEKVKVLKSMAQVRLEDVVVGQYRSRT---TRGSTLPGY
Db	NEKVKVLQSMSQVALEDVTLGQYRGRSGAGRSGGADLPGY
Mp	DEKVKVIRSIRPIDMDNVVLGQYKGKR---DGDGVLPGY
Gs	DEKVKFLRSIRPLKASDFVLGQYRDRQ-----NPQRSY
Pt	NAKLEILRKIPVINLEDCLFGQY-----EGY
Eccyt	DEKVKVLRSLRRIDRSNVHEVTVRGQYTSGFVQGKKVPGY
Eccyt.	DEKVKVLKSLRRIDRSNVREKTVRGQYTAGFAQGKKVPGY
Acyt	TEKVKVLQATRLADVHNLSRSAIRGQYSAGWMKGQQVPGY
Clustal Consensus	*:::..:.*

	490	500	510	520
Hvcyt	KDDPTVPD-DSNTPTFASIVLRVHNERWEGVPFILKAGKA		
TaCy	KDDPTVPD-DSNTPTFASIVLRVHNERWEGVPFILKAGKA		
OsCy	KDDPTVPD-DSNTPTFASVFRVHNERWEGVPFILKAGKA		
NtCy	KDDPTVPG-NSNTPTFATMVLRIHNERWEGVPFIMKAGKA		
Ptcyt	RDDPTVPD-HSNTPTFATVVLRIHNERWEGVPFILKAGKA		
Atcyt1	RDDPTVPN-DSNTPTFATTILRINNERWEGVPFILKAGKA		
Atcyt2	RDDDTVPN-DSNTPTFATTILRIHNERWEGVPFILKAGKA		
Mtcyt	RDDPTVPD-DSNTPTFATTILRIHNERWEGVPFIVKAGKA		
Ppcyt	KDDQTVPN-DSSTPTFASLVLHINNERWDGVPFILKAGKA		
Cvcyt	TDDPTVPA-GSKTPTFASVTVFIDNDRWAGVPFVLKAGKA		
Mpcyt	LDDPTVPA-GSKAPTFAAMCVMRINNERWDGVPFIVEAGKA		
Dmcyt	VEDPTVSN-DSNTPTYAARSLKINNERWQGVPFILRCGKA		
Hscyt.	LDDPTVPR-GSTTATFAAVVLYVENERWDGVPFILRCGKA		
Bdcyt	LEDPTVPK-GSVTPTFAAGVFYIHNERWEGVPFILKSGKA		
Sccyt	VDDDTVDK-DSKCVTFAMTFNIENERWEGVPIMMRAGKA		
PpP2	LDDKTVPK-NSITPTFAAAAVFIDNARWDGVPFLMKAGKA		
PpP1	IEDKTVPN-NSITPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKA		
HvP2	TEDKTVPK-GSLTPTFAAAALFINNARWDGVPFLMKAGKA		
OsP2	TEDKTVPK-DSVTPTFAAAALFINNARWDGVPFLMKAGKA		
MtP2	IDDKTVPK-GSLTPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKA		
PtP2	TDDNTVPK-GSLTPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKA		
NtP2	TDDKTVPK-DSLTPPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKA		
AtP2	TDDKTVPK-GSLTPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKA		
NtP1	TDDPTVPN-GSVTPTFSAAALFINNARWDGVPFLMKAGKA		
PtP1	TDDPTVPK-DSRTPTFAAAALFINNARWDGVPFLMKAGKA		
SoP1	TDDPTVPN-NSVTPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKA		

AtP1	TDDPTVPN-HSLTPTFAAAAMFINNARWDGVPFLMKAGKA
OsP1	VDDPTVPS-GSITPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKA
Cv	LDDDTVPP-NSITPTFAACAVFVNNARWDGVPFLLKAGKA
Db	LDDATVPK-GSLCPTFAAIALHINNARWDGVPFLLKAGKA
Mp	LDDDTVPP-GSRCPTFAAMALFIDNARWDGVPFLIKAGKA
Gs	LSEPGVMN-DSHTPTFAACVFQVDNRRWSGVPFLMKAGKA
Pt	KDDSSIENRDTVTPTYACIRTWVHNETWRNVPFVLEAGKA
Eccyt	LEEEGANK-TSNTETFVAIRVDIDDWRWSGVPFYLRGKR
Eccyt.	LEEEGANK-SSNTETFVAIRVDIDNWRWAGVPFYLRGKR
Acyt	RTEPGVDP-NSSTPTYVGMKFLVDNWRWQGVPFYLRGKR
Clustal Consensus	: : *: :. : * .** :. **
	530 540 550 560

Hvcyt	LNSRKAEIRVQFKDVPGDIFKC-----KKQG---
TaCy	LNSRKAEIRVQFKDVPGDIFKC-----KKQG---
OsCy	LSSRKAEVRVQFKDVPGDIFKC-----KRQG---
NtCy	LNSRKAEIRVQFKDVPGDIFRC-----KKQG---
Ptcyt	LNSRKAEIRVQFKDVPGDIFKC-----QKQG---
Atcyt1	MSSKKADIRIQFKDVPGDIFKC-----QNQG---
Atcyt2	LNSRKAEIRIQFKDVPGDIFRC-----QKQG---
Mtcyt	LNSRKAEIRVQFKDVPGDIFRS-----KKQG---
Ppcyt	LDSRKAEIRVQFKDAPGDIFKC-----KKQG---
Cvcyt	LNERKAEIRVQLRSTPHFVFNG-----EPEA---
Mpcyt	LDEHKCEIRVQLKDVPGDLFST-----ERAAGRQ
Dmcyt	LNERKAEVRIQYQDVLGDIFEG-----NTK----
Hscyt.	LNERKAEVRLQFHDVAGDIFHQ-----QCK----
Bdcyt	LDEQKTEIRIQFKDVPGNIYAE-----TS-----
Sccyt	LNESKVEIRLQYKAVASGVFKD-----IPN----
PpP2	LHKKRAEIRVQFRHVPGNLYKR-----SFGTDLDL
PpP1	LHTKRAEIRVQFRHVPGSLYKR-----SFGADIDQ
HvP2	LHTKQAEIRVQFRHVPGNLYKG-----SFGTDLDR
OsP2	LHTKGAEIRVQFRHVPGNLYKR-----SFGTDLDT
MtP2	LHTKRAEIRVQFRHVPGNLYNR-----NFGADLDH
PtP2	LHNKSAEIRVQFRHVPGNLYNR-----NFGTDLDR
NtP2	LHTRSAEIRVQFRHVPGNLYNK-----NFGSDLQ
AtP2	LHTRSAEIRVQFRHVPGNLYNR-----NTGSDLQ
NtP1	LHTRRAEIRVQFRHVPGNLYKR-----NFGTDLDK
PtP1	LHTRRAEVRVQFRHVPGNLYKR-----NFGTDLDK
SoP1	LHTKRAEIRVQFRHVPGNLYKK-----TFGTDLDK
AtP1	LHTRGAEIRVQFRHVPGNLYKK-----SFATNLDN
OsP1	LHTRRAEIRVQFRRVPGNLYGRRSRVGGGGTTATRELEK
Cv	LHSRVAEIRVQFRHVPGNLYRN-----KLGLDLDK
Db	LHTRGAEIRVQFRHVPGNIFKH-----KVGPNIIDM
Mp	LHKRQAEIRVQFHHSPGNLYKK-----QLGNREE
Gs	LDERKAEIRIQFQSVPGGLFSQ-----VVSSHL
Pt	LNDRLCEIRLHFRGVKNGQPNS-----
Eccyt	LPSKCSEVVVYFKNPALNLFHD-----SYQQQL
Eccyt.	LPTKCSEVVVYFKTPELNLFKE-----SWQDL
Acyt	MPKKVSEISIHFRDVPSRMFQS-----AAQQR
Clustal Consensus	: :: :
	570 580 590 600

Hvcyt	-RNEFVIRLQPSEAMYMKLT----VKKPGLEMAT--EQSE
TaCy	-RNEFVIRLQPSEAMYMKLTTEFVQVKKPGLEMAT--EQSE
OsCy	-RNEFVIRLQPSEAMYMKLT----VKKPGLEMAT--EQSE
NtCy	-RNEFVIRLQPSEAMYMKLT----VKKPGLEMST--VQSE
Ptcyt	-RNEFVIRLQPSEAMYMKLT----VKQPGLEMST--VQSE
Atcyt1	-RNEFVIRLQPSEAMYMKLT----VKQPGLEMQT--VQSE
Atcyt2	-RNEFVIRLQPSEAMYMKLT----VKQPGLDMNT--VQSE
Mtcyt	-RNEFVIRLQPSEAIYMKLT----VKQPGLEMSA--VQSE
Ppcyt	-RNEFVMRLQPKEAMYMKLT----VKEPGLDMRA--TQSE
Cvcyt	MRNELVVRLQPDEAIYKLKI----VKKPGLEIDT--AISE

Mpcyt	ARNEFVVRLQPDPAIYMLMT----
Dmcyt	-RNELVIRVQPGEALYFKMMT----KSPGITFDI--EETE
Hscyt.	-RNELVIRVQPNЕAVYTKMMT----KKPGMFFNP--EЕSE
Bdcyt	-RNELVIRVQPHEAVYMKFMK----KQPGLSNTP--IISE
Sccyt	--NELVIRVQPDAAVYLKFN----AKTPGLSNAT--QVTD
PpP2	ATNELVIRVQPDЕAIYLKINN----KVPGLGMRL--DRSN
PpP1	ATNELVIRVQPDЕAIYLKINN----KVPGLGMRL--DRSN
HvP2	ATNELVIRVQPDGGIYLKINN----KIPGLGMRL--DRSN
OsP2	ATNELVIRVQPDЕAIYLKINN----KIPGLGMRL--DRSN
MtP2	ATNELVIRVQPDЕAIYLKINN----KIPGLGMKL--DRSN
PtP2	ATNELVIRVQPDЕAIYLKINN----KVPGLGMRL--DRSN
NtP2	ATNELVIRVQPNЕAIYLKINN----KVPGLGMRL--DRSN
AtP2	ATNELVIRVQPDЕAIYLKINN----KVPGLGMRL--DRSN
NtP1	ATNELVLRQLQPDЕAIYLKINN----KVPGLGMRL--DRSD
PtP1	ATNELVLRVQPDЕAIYLKINN----KVPGLGMRL--DRSD
SoP1	ATNELVLRVQPDЕAIYLKINN----KVPGLGMRL--DRTD
AtP1	ATNELVIRVQPDЕGIYLRINN----KVPGLGMRL--DRSD
OsP1	ATNELVLRVQPDЕAIYLKINS----KVPGLGMRL--DSSD
Cv	ATNELVIRIQPNEGIIYLVNN----KVPGLGLRI--DTTR
Db	TTNELVIRIQPRESIIYLKINN----KVPGLGMRL--DTTK
Mp	NSNELVFRIQPDЕGIYLNINS----KIPGLGMRL--DQTD
Gs	PHNELVIIVQPDЕAIYMRILS----KAPGFTSRL--ЕЕAR
Pt	----LVLRLQPVPTIFLTANV----KTPGFSYNP--VSAR
Eccyt	PQNKLIIRLQPDЕGVEIQILN----KIPGLDHKHLRQTTK
Eccyt.	PQNKLTIRLQPDЕGVDIQVLN----KVPGLDHKHLNLQITK
Acyt	NANILAMRIQPNЕGISLRFDV----KMPGAЕFRT--RSVD
Clustal Consensus	: . : ** : * **

	610	620	630	640
			
Hvcyt	LDLSYGMRYQD-VKIPЕAYERLILDTIRGDQQHFVRRDEL			
TaCy	LDLSYGMRYQD-VKIPЕAYERLILDTIRGDQQHFVRRDEL			
OsCy	LDLSYGMRYQN-VKIPЕACERLILDTIRGDQQHFVRRDEL			
NtCy	LDLSYGQRYQG-VVIPЕAYERLILDTIRGDQQHFVRRDEL			
Ptcyt	LDLSYKQRYQG-VAIPЕAYERLILDTIRGDQQHFVRRDEL			
Atcyt1	LDLSYKQRYQD-VSIPЕAYERLILDTIRGDQQHFVRRDEL			
Atcyt2	LDLSYGQRYQG-VAIPЕAYERLILDTIKGDQQHFVRRDEL			
Mtcyt	LDLSYGQRYQG-ITIPЕAYERLILDTIRGDQQHFVRRDEL			
Ppcyt	LDMSYHQRYQD-IVIPЕAYERLILDTIRGDQQHFVRRDEL			
Cvcyt	LDLDYRQRYPG-VVIPDAYPRLILDSIRGDQQHFVRRDEL			
Mpcyt	LELLYTRKYDG-TYIPЕAYERLILDCVNGDQQHFVRRDEL			
Dmcyt	LDLTYEHRYKD-SYLPDAYERLILDVFCGSQMHFVRS-AA			
Hscyt.	LDLTYGNRYKN-VKLPDAYERLILDVFCGSQMHFVRSDEL			
Bdcyt	LDMSYNKRYSD-IKIPDAYESLILDALNGDKSNFVRDDEL			
Sccyt	LNLTYASRYQD-FWIPЕAYEVLIRDALLGDHSNFVRDDEL			
PpP2	LNLHYADRYD--REIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
PpP1	LNLHYADRYN--REIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
HvP2	LNLHYAARYP--KEIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
OsP2	LNLHYAARYS--KEIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
MtP2	LNLHYAARYS--KEIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
PtP2	LHLHYAARYS--KEIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
NtP2	LNLLYSARYS--KEIPDPYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
AtP2	LNLLYSARYS--KEIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
NtP1	LNLLYKAKYR--GEIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
PtP1	LNLLYSARYP--REIPDAYERLLLLDAIAGERRLFIRSDEL			
SoP1	LNLСYSTRYR--GEIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
AtP1	LNLLYRSRYP--REIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
OsP1	LNLLYSERYP--AEIPDAYERLLLLDAIEGERRLFIRSDEL			
Cv	LDLTYKSKYE--ATLPDAYERLILDCINGDRRLFIRNDEL			
Db	LDLVYNDAYS--KELPDAYERLLLLDVVNGDKRLFIRDDEL			
Mp	LDLQYKTKYSG-GALPDAYERLILDVVQGDKRLFIRNDEL			
Gs	LNLFYRTAWEDSKDIPDAYERLILDVIHGEKSRLFIRDDEL			
Pt	MQVDYGQALM-----PDAYTRLLLLDVFRGKQANFVRDDEL			
Eccyt	LDLSFSETFN-QQHLADAYERLILLETMRGIQALFVRRDEV			

Eccyt.	LDLSYSETFN-QTHLADAYERLLLETMRGIQALFVRRDEV
Acyt	MDFSYGS-FG-IEATSDAYDRLFLDCMMGDQTLFTRADEV
Clustal Consensus	:. . : . : . * : * *
	650 660 670 680

Hvcyt	KAAWQIFTPLLHNIDA--GKLKAVSYKPGSRGPKEADELS
TaCy	KAAWQIFTPLLHDIDA--GKLKAVSYKPGSRGPKEADELS
OsCy	KAAWQIFTPLLHDIDE--GKVKSIPYQPGSRGPKEADELS
NtCy	KAAWEIFTPLLHRIDD--GEIKPIPYKPGSRGPAAEADELL
Ptcyt	KAAWEIFTPLLHRIDD--GEMKPLQYQPGSRGPVEADELL
Atcyt1	KAAWEIFTPLLHRIDK--GEVKSVPYKQGSRGPAEADQLL
Atcyt2	KVAWEIFTPLLHRIDK--GEVKSIPYKPGSRGPKEADQLL
Mtcyt	KASWQIFTPLLHKIDR--GELKPVYKPGSRGPAAEADELL
Ppcyt	RVaweIFTPLLHRIDV--GKLELIPYKEGSRGPAAEADELN
Cvcyt	RAAWAICTPILHLIDA--GALPVHPYPYGSRGPPAEADELL
Mpcyt	AAAWSVFTPLLKYIDA--GGLAPEVYPYGCDGPSNARTLR
Dmcyt	AQAWRIFTPI LHQIEK--EHIRPITYQYGSRGPK EADRKC
Hscyt.	REAWRIFTPLLHQIEL--EKPKPIPYIYGSRGPT EADELM
Bdcyt	NAAWKIFTPLLHEIEK--SKVQPEPYTFGTRGPAGLNTFV
Sccyt	DISWGIFTPLLKHIERP-DGPTPEIYPYGSRGPKGLKEYM
PpP2	DAAWALFTPLLNELEK--RKISP ELYPYGSRGPVGAHYLA
PpP1	DAAWALFTPLLKELEK--RKVAP ELYPYGSRGPVGAHYLA
HvP2	DAAWELFTPLLKELEQ--KRMAPELYPYGSRGPVGAHYLA
OsP2	DAAWELFTPLLKELEE--KRIAPELYPYGSRGPVGAHYLA
MtP2	DAAWSLFTPVLNEIEE--KKITPEYYPYGSRGPVCAHYLA
PtP2	DAAWALFTPVLKELEE--KKI IPEYYPYGSRGPVGAHYLA
NtP2	DAAWSLFTPVLKELED--KKIVPEYYPYGSRGPIGAHYLA
AtP2	DAAWSLFTPLLKEIEE--KKRIPEYYPYGSRGPVGAHYLA
NtP1	DAAWALFTPLLKELEE--KKIAPELYPYGSRGPVGAHYLA
PtP1	DAAWALFTPMLKELEL--KKIVPELYPHGSRGPVGAHYLA
SoP1	DAAWSLFTPLLKELEE--KKVAP ELYPYGSRGPVGAHYLA
AtP1	DAAWDLFTPALKELEE--KKI IPELYPYGSRGPVGAHYLA
OsP1	DAAWAIFTPVLADLEA--NKVAP ELYPYGSRGPVGAHYLA
Cv	EVAW EKFTPVLKELEE--RGVQPELYPYGSRGPVGAHYLA
Db	EQAWNIFTPVLHEIER--RKVAP ELYPYGSRGPVGAHYLA
Mp	EAAWKLF TPMLDRIEE--DEIAPELYPYGSRGPIGAHYLA
Gs	EVAWNIFTPSLKEMEMAQDSWKPILYDYGGRGPIESDYLA
Pt	LASWKIFTPI LNQTEQ--LNIVPEPYMRGSTGPDKRVEFL
Eccyt	EEAWKWVDSIMDAWAMDNDSP--KPYQAGTWGPVASVAMI
Eccyt.	EEAWKWVDSITEAWAMDNDAP--KPYQAGTWGPVASVAMI
Acyt	EAAWQVVTPALSVWDSPADPATIPQYEAGTWEPAEAEFLI
Clustal Consensus	:* . * * *
	690 700

Hvcyt	EKVG YMQ--THGYIWIPPTLA-----
TaCy	EKVG YMQ--THGYIWIPPTLA-----
OsCy	ERVGYMQ--THGYIWIPPTLA-----
NtCy	QNVGYVQ--THGYIWIPPTL-----
Ptcyt	AKAGYVQ--THGYIWIPPTL-----
Atcyt1	KKAGYMQ--THGYIWIPPTL-----
Atcyt2	EKAGYLQ--THGYIWIPPTL-----
Mtcyt	EKAGYVQ--THGYIWIPPTL-----
Ppcyt	ARVG YRR--TEGYCWKPPTLQAVGNSRM
Cvcyt	ARAGFVK--NSRYDWHEAGAARL-----
Mpcyt	ERAGYVQ--ARRK-----
Dmcyt	EENNFKY--SGSYKWHGGKAATSNH---
Hscyt.	KRVGFQY--EGTYKWNPHKL-----
Bdcyt	EKLGYAR--NLDYSWGPSKI-----
Sccyt	QKHKYVMPEKHYPYAWPVTKPEDTKDN--
PpP2	AK-----YNVRWGDNSSELDSA---
PpP1	AK-----YNVRWGDNSSETSDSV--
HvP2	AK-----YNVRWGDLGGSEH-----

OsP2	AK-----YNVRWGDLTTEQKA----
MtP2	AR-----YNVRWGDLGLDVEQ----
PtP2	AR-----YKVRWGDLGIEQ-----
NtP2	AR-----YKVRWGDLV-----
AtP2	AK-----HKVQWGDVSIQD-----
NtP1	AK-----HNVRWGDLSGDD-----
PtP1	AK-----YNVRWGDLSSDDS-----
SoP1	AK-----HNVRWGDLSGEDS-----
AtP1	SK-----YNVRWGDLGEA-----
OsP1	AN-----HNVRWGDIS-----
Cv	AK-----HGVRWGDLAADDE-----
Db	AK-----YNVRWGDLTEDEI-----
Mp	SR-----WNVRWGDTME-----
Gs	AK-----YAVQWSEGD-----
Pt	RSVG-----AIPSWSPPPSAL-----
Eccyt	TR-----DGRSWNEVE-----
Eccyt.	TR-----DGRSWNEFE-----
Acyt	NQ-----DGRRWRL-----
Clustal Consensus	

Figura 6.2: Allineamento amminoacidico fra sequenze G6PDH note.

Leggenda: cyt: isoforma citosolica G6PDH; P2 isoforma plastidiale G6PDH, P1 isoforma cloroplastica G6PDH; Hv *Hordeum vulgare*; Ta *Triticum aestivum*; Os *Oryza sativa*; Nt *Nicotiana tabacum*; Pt *Populus trichocarpa*; At *Arabidopsis thaliana*; Mt *Medicago truncatula*; Pp *Physcomitrella patens*; Cv *Chlorella vulgaris*; Dm *Drosophila melanogaster*; Hs *Homo sapiens*; Bd *Batrachochytrium dendrobatidis*; Sc *Saccharomyces cerevisiae*; So *Spinacea oleracea*; Db *Dunaliella bioculata*; Acy *Anabaena cylindrica*; Gs *Galdieria sulphuraria*; Ec *Escherichia col*; Pt *Phaeodactylum tricornutum*

Test di espressione condotto su colonie Cyt-G6PDH-pET3D/BL21DE3

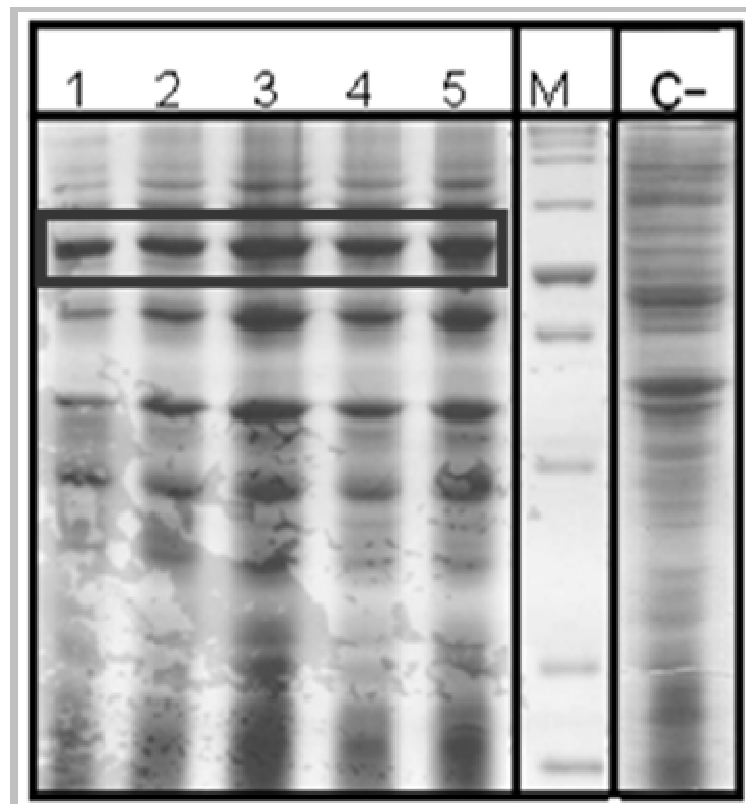


Figura 6.3: Elettroforesi SDS-PAGE

Alcune colonie ricombinanti cyt-G6PDH/pET3d in BL21 (DE3) erano analizzate per valutare l'espressione della proteina ricombinante.

Leggenda: 1-5) differenti colonie selezionate per valutare la produzione della proteina ricombinante; M) maker di peso molecolare; C-) controllo negativo.

Il riquadro indica la proteina ricombinante nelle colonie analizzate, la proteina è assente nel controllo negativo, ossia cellule BL21DE3 trasformate con il solo plasmide pET3D nativo.

Test di solubilità effettuato sulla colonia ricombinante cyt-G6PDH-pET3d/BL21 (DE3)

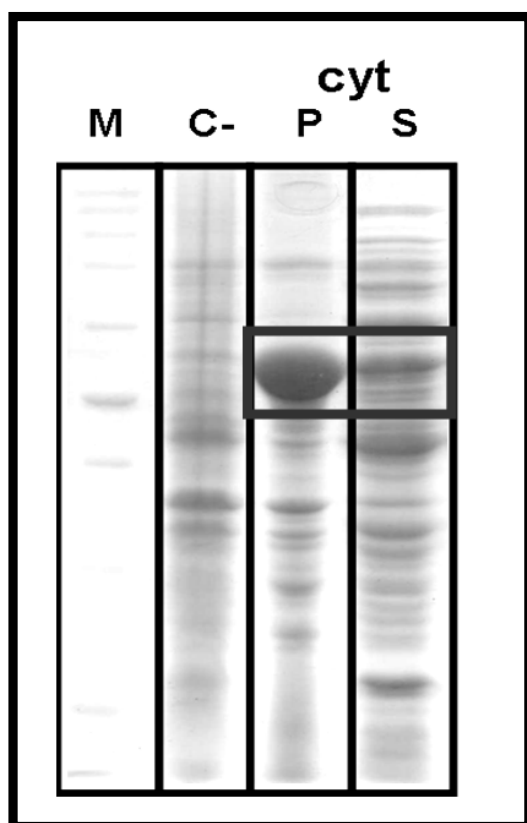


Figura 6.4: SDS-PAGE del lisato batterico di *E.coli* trasformate con cyt-G6PDH per valutare la localizzazione della proteina ricombinante prodotta.

Leggenda: C)- controllo negativo (cellule di *E.coli* BL21 DE3 trasformate con il plasmide nativo pET3d); cyt) campione; P) porzione insolubile; S) porzione solubile; M) marcatore di peso molecolare

Ringraziamenti

Università di Napoli Federico II:

Prof.re Sergio Esposito

Dott.ssa Donata Cafasso

Dott.ssa Manuela Cardi

Simone Landi

Università di Zurigo:

Prof.re Beat Keller

Gerhard Herren